

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Mecanismos virucidas da irradiação por feixe de eletrões em adenovírus humanos

Joana Margarida Lopes Roque

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Doutora Sandra Cabo Verde
Professora Doutora Maria Filomena Caeiro



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares do Instituto Superior Técnico sob a orientação direta da Doutora Sandra Cabo Verde.

A Professora Doutora Maria Filomena Caeiro foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora Doutora Sandra Cabo Verde por ter confiado em mim para desenvolver este trabalho e por todo o conhecimento e apoio que me deu desde o primeiro dia.

Em segundo lugar, mas de forma não menos importante, agradeço à minha co-orientadora Professora Doutora Maria Filomena Caeiro pela disponibilidade e ajuda prestadas, sobretudo no processo de escrita desta tese.

Agradeço também à Joana Madureira por todo o apoio no trabalho de laboratório realizado e tempo dispensado na transmissão do seu conhecimento e amor pela ciência.

Agradeço ao Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C2TN) do Instituto Superior Técnico, especialmente ao Laboratório de Ensaaios Tecnológicos em Áreas Limpas (LETAL) pelas condições disponibilizadas para a realização deste trabalho.

Agradeço à Instalação de Radiações Ionizantes (IRIS), especialmente ao Doutor Pedro Santos pela irradiação das amostras virais.

Agradeço à minha colega Maria Inês Elias que partilhou este ano comigo, quer no laboratório quer fora dele, e que teve sempre uma atitude otimista e motivadora.

Quero agradecer de uma forma especial a toda a minha família e amigos por me proporcionarem esta oportunidade, pela compreensão e apoio incondicionais.

Por fim, queria agradecer a todas as pessoas que se cruzaram no meu caminho e que de alguma forma permitiram que este trabalho fosse realizado.

Resumo

O adenovírus é o vírus entérico mais prevalente nas águas a nível mundial. Este facto está, sobretudo, relacionado com a ineficácia da sua remoção nas águas pelos tratamentos de efluentes convencionais, levando à ocorrência de surtos de infeções por este vírus que representam um problema grave de saúde pública. O objetivo principal desta dissertação foi estudar os mecanismos virucidas da irradiação por feixe de eletrões em adenovírus humanos, através da avaliação dos efeitos desta tecnologia a nível das proteína e do genoma viral. O conhecimento obtido através deste estudo pode ser útil para o desenvolvimento de tratamentos alternativos para a desinfecção de águas. Para além disso, este projeto vai ao encontro de um dos objetivos de desenvolvimento sustentável da Organização das Nações Unidas (ONU), nomeadamente na disponibilização e gestão sustentável de água e saneamento para todos.

O adenovírus humano tipo 5 (HAdV-5) inoculado em dois tipos de substratos aquosos (PBS e efluente) foi tratado por irradiação por feixe de eletrões a uma gama de doses entre os 3 e os 21 kGy. Foram avaliadas a amplificação de fragmentos do genoma do HAdV-5, a abundância e antigenicidade das suas proteínas estruturais como também a sua infeciosidade. Em todos os ensaios realizados, o efeito da irradiação por feixe de eletrões foi observado às doses mais elevadas de radiação (12 a 21 kGy), independentemente do substrato utilizado. Apesar destas semelhanças, este efeito foi mais evidente nas amostras em PBS. As proteínas virais apresentaram diferente sensibilidade à irradiação por feixe de eletrões em ambos os substratos, sendo que das três proteínas estruturais analisadas (hexão, *penton base* e fibra) a proteína hexão demonstrou possuir uma maior radiorresistência. Para todas as doses de radiação, a percentagem de ligação relativa dos anticorpos monoclonais às proteínas hexão foi sempre mais elevada nas suspensões virais em efluente do que em PBS. A redução máxima do título viral obtida foi cerca de 7 e 5 log UFP/mL para as doses de 20 e 19 kGy em PBS e efluente, respetivamente. As diferenças observadas entre os dois substratos utilizados podem ser explicadas pelo efeito protetor que a matéria orgânica, presente no substrato, possa ter na irradiação do vírus. De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que a diminuição da infeciosidade viral possa estar relacionada com os danos no DNA e a alteração das proteínas.

Em suma, e de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA), o feixe de eletrões é capaz de reduzir o título viral do HAdV-5 em mais de 99,99% (4 log UFP/mL), em ambos os substratos testados, indicando que este tipo de tecnologia é eficaz na desinfecção viral de efluentes e que pode vir a ser utilizada como tratamento terciário em estações de tratamento de águas.

Palavras-chave: vírus entéricos; adenovírus humano; ação virucida, irradiação por feixe de eletrões; tratamento de efluentes

Abstract

Adenovirus is the most prevalent enteric virus in waters worldwide. This fact is mainly associated to the ineffectiveness of its removal from water by conventional treatment, leading to outbreaks of infections by this virus that pose a serious public health problem. The main goal of this dissertation was the study of the virucidal mechanisms of electron beam irradiation in human adenoviruses by evaluating the effects of this technology on the viral proteins and genome. The insights obtained from this study may be useful for the development of alternative water disinfection approaches. In addition, this project meets one of United Nations' (UN's) sustainable development goals, namely the provision and sustainable management of water and sanitation for all.

Human adenovirus type 5 (HAdV-5) inoculated in two types of aqueous substrates (PBS and domestic wastewater) was treated by electron beam irradiation at a dose range between 3 and 21 kGy. The amplification of HAdV-5 genome, the abundance and antigenicity of its structural proteins as well as its infectivity were evaluated. In all assays performed, the effect of electron beam irradiation was found at the highest doses of radiation (12 to 21 kGy), regardless of the substrate used. Despite these similarities, this effect was most evident in PBS samples. Viral proteins presented different sensitivity to electron beam irradiation in both substrates and, among the three structural proteins (hexon, penton base and fiber) analyzed, the hexon protein showed higher radioresistance. For all radiation doses, the percentage of relative binding of monoclonal antibodies to the hexon proteins was always higher in the viral suspensions in wastewater than in PBS. The maximum reduction in viral titer was about 7 and 5 log PFU/mL for irradiation with 20 and 19 kGy in PBS and in wastewater substrate, respectively. The differences observed between the two substrates can be explained by the protective effect of the organic matter present in the substrate may have on viral irradiation. According to the obtained results, it is suggested that the decrease in virus infectivity may be related to DNA damage and to protein alterations.

In summary, and in accordance with the parameters set by the United States Environmental Protection Agency (US EPA), electron beam irradiation is capable of reducing HAdV-5 viral titers by more than 99.99% (4 log UFP/mL) in both substrates assayed, indicating that this type of technology is effective for viral wastewater disinfection and may be used as a tertiary treatment in water treatment plants.

Keywords: enteric viruses, human adenovirus, virucidal action, electron beam irradiation, wastewater treatment

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	IV
Abstract	V
Índice de tabelas	VII
Índice de figuras	VIII
Lista de abreviaturas.....	IX
Lista de unidades	XI
1. Introdução.....	1
1.1 Adenovírus	2
1.1.1. Estrutura do virião	2
1.1.2. Ciclo infeccioso.....	4
1.1.3. Organização e expressão do genoma viral	6
1.1.4. Impacto e relevância.....	7
1.2. Métodos de desinfecção de adenovírus.....	8
1.3. Objetivo.....	9
2. Material e métodos	10
2.1 Vírus e linha celular	10
2.2 Produção e titulação de stock viral	10
2.3 Preparação das amostras e caracterização dos substratos.....	11
2.4 Processo de irradiação por feixe de elétrons.....	12
2.5 Extração de DNA viral e PCR.....	12
2.6. Análise das proteínas virais por SDS-PAGE.....	13
2.7. Western-blotting.....	14
2.8. ELISA.....	15
3. Resultados e discussão	16
3.1. Análise do efeito da irradiação por feixe de elétrons nas proteínas virais.....	16
3.2 Análise do efeito da irradiação por feixe de elétrons no genoma viral.....	20
3.3 Análise do efeito da irradiação por feixe de elétrons na infeciosidade viral	23
3.3.1. Danos no DNA e infeciosidade viral.....	25
3.3.2. Alterações nas proteínas e infeciosidade viral.....	25
4. Conclusão	26
5. Perspectivas futuras.....	27
6. Referências	28

Índice de tabelas

Tabela 2.1- <i>Primers</i> utilizados no PCR.....	13
Tabela 3.1- Valores de D_{10} calculados para o HAdV-5 nos diferentes substratos	24

Índice de figuras

Figura 1.1- Estrutura do adenovírus	3
Figura 1.2- Ciclo infeccioso do adenovírus humano.....	5
Figura 1.3- Organização do genoma do adenovírus humano tipo 5.....	6
Figura 1.4- Transcrição do genoma do adenovírus	7
Figura 2.1- Região codificante do fragmento de tamanho 1 kpb	13
Figura 2.2- Região codificante do fragmento de tamanho 10 kb	13
Figura 3.1- <i>Western-blotting</i> dos polipéptidos presentes nas suspensões de HAdV-5 (10^7 UFP/mL) em PBS e efluente (amostras tratadas e não tratadas).	18
Figura 3.2- ELISA realizado para a detecção qualitativa da percentagem de ligação relativa dos anticorpos monoclonais anti-hexão às proteínas hexão do HAdV-5.	20
Figura 3.3- Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos amplificados por PCR	22
Figura 3.4- Curvas de viabilidade das amostras de HAdV-5 em dois tipos de substratos aquosos (PBS e efluente).....	24

Lista de abreviaturas

ADP: *Adenovirus Death Protein*

Adv: Adenovírus

CAR: *Coxsackie Adenovirus Receptor*

CQO: Carência Química de Oxigênio

DBPs: *Disinfection By-Products*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática do inglês “*Enzyme-Linked Immunoborbent Assay*”

ETAR: Estação de Tratamento de Águas Residuais

EV: Enterovírus

FAS: Sulfato de amônio ferroso do inglês “*Ferrous Ammonium Sulphate*”

FBS: Soro fetal bovino do inglês “*fetal bovine serum*”

HAdV: Adenovírus humano

HAdV-5: Adenovírus humano tipo 5

HAV: Vírus da hepatite A

HEV: Vírus da hepatite E

ITRs: *Inverted Terminal Repeats*

LINAC: Acelerador linear de elétrons do inglês “*LINear ACcelerator*”

Mabs: Anticorpos monoclonais do inglês “*Monoclonal antibodies*”

MEM: *Minimum Essential Media*

MLP: *Major Late Promoter*

MLTU: *Major Late Transcription Unit*

MOI: Multiplicidade de infecção do inglês “*Multiplicity Of Infection*”

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONU: Organização das Nações Unidas

PBS: Tampão fosfato salino do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”

PBST: Tampão fosfato salino com Tween 20 do inglês “*Phosphate Buffered Saline with Tween 20*”

PeV: Parechovirus

NoV: Norovírus

RV: Rotavírus

US EPA: Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos do inglês “*United States Environmental Protection Agency*”

UV: Ultravioleta

Lista de unidades

atm: atmosfera

cm: centímetro

g: grama

Gy: Gray

h: horas

J: joule

kDa: quilo Dalton

kg: quilograma

kGy: quilo Gray

kpb: quilo par de base

L: litro

MeV: Mega eletrão Volt

M: molar

mA: miliampere

mM: milimolar

mg: miligrama

mL: mililitro

mm: milímetros

nm: nanómetro

rpm: rotações por minuto

U: unidades

UFP: unidades formadoras de placas

V: volt

°C: graus Celcius

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

μm: micrómetro

1. Introdução

Os vírus são, na sua maioria, os agentes infecciosos de menor dimensão e mais abundantes da Terra (Madigan, Martinko and Brock 2006; Flint *et al.* 2015). Estes agentes infecciosos têm a particularidade de serem parasitas intracelulares obrigatórios e, como tal, estão extremamente dependentes dos seus hospedeiros para a sua multiplicação. Geralmente são constituídos por um genoma que pode ser de RNA ou DNA envolvido por uma cápside proteica protetora e, em alguns casos, também por uma membrana lipídica (Gelderblom, 1996). Os vírus infetam uma grande variedade de organismos, mas a sua maioria apenas infeta um tipo específico de células num hospedeiro. De acordo com o seu ciclo de replicação podem ser classificados como vírus lisogénicos ou líticos. O ciclo lisogénico caracteriza-se, na maior parte dos casos, pela incorporação do genoma viral no cromossoma da célula infetada, através de recombinação genética. No ciclo lítico esta incorporação não ocorre, tendo como consequência o aumento da velocidade de produção de novas partículas virais que abandonam a célula hospedeira, por vezes, através da lise celular (Flint *et al.* 2015).

Os vírus entéricos humanos caracterizam-se pela sua capacidade de infetar e se replicarem no trato gastrointestinal dos seus hospedeiros. Os indivíduos que sofram de uma gastroenterite viral podem excretar cerca de 10^5 a 10^{11} partículas virais por cada grama de fezes (Bosch 1998). Estes vírus excretados nas fezes podem ser transmitidos por via fecal-oral através da exposição a águas e alimentos contaminados (Bisseux *et al.* 2018). Pensa-se que cerca de 150 vírus entéricos diferentes possam estar presentes em águas contaminadas (Wong *et al.* 2012). Embora as infeções por estes vírus estejam primariamente associadas a diarreias e gastroenterites em humanos, também podem causar infeções respiratórias, conjuntivites, hepatites e doenças cuja taxa de mortalidade é muito alta, como meningites assépticas, encefalites e até paralisia em indivíduos imunocomprometidos, quer em países em desenvolvimento como desenvolvidos (Kocwa-Haluch 2001; Okoh, Sibanda and Gusha 2010). Para além das doenças mencionadas, alguns destes vírus já foram também associados a doenças crónicas como a miocardite e a diabetes insulínica dependente (Wagenknecht, Roseman and Herman 1991; Koide *et al.* 1992).

Os vírus entéricos podem estar presentes nos ambientes aquáticos ou, de forma mais frequente, são introduzidos por atividades humanas como fugas em esgotos e sistemas sépticos, escoamentos urbanos e agrícolas e, no caso das águas marinhas e de estuários, através de descargas de esgotos e efluentes (Fong and Lipp 2005). Estes vírus podem, então, ser transportados através de águas subterrâneas, águas de estuário, água do mar, rios, aerossóis emitidos por estações de tratamentos de esgotos, água insuficientemente tratada, águas de consumo e poços privados que recebam água tratada ou não tratada direta ou indiretamente (Yates, Gerba and Kelley 1985; Sobsey *et al.* 1986; Rose *et al.* 1987; Gerba and Rose 1990; Lee and Kim 2002; Lipp *et al.* 2002). O seu transporte e persistência no ambiente levam à frequente ocorrência de surtos provocados pelo consumo e uso recreativo de água contaminada e também pelo consumo de bivalves recolhidos em águas igualmente contaminadas (Dewailly, Poirier and Meyer 1986; Cecuk *et al.* 1993; Muscillo *et al.* 1994; LIPP and ROSE 1997; Jiang, Noble and Chu 2001; Lee and Kim 2002). Em 2014 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que cerca de 842 000 mortes por ano sejam atribuídas ao consumo de águas provenientes de fontes contaminadas, sendo que 361 000 são de crianças com idades inferiores a 5 anos, sobretudo em países em desenvolvimento (WHO 2014).

O grupo dos vírus entéricos inclui diferentes tipos de vírus como os adenovírus (AdV), enterovírus (EV), parechovirus (PeV), norovirus (NoV), rotavírus (RV), vírus da hepatite A (VHA) e da hepatite E (VHE) (Bisseux *et al.* 2018). Deste amplo grupo, os AdV e os EV destacam-se pelo seu papel importante como indicadores de contaminação fecal nas águas (Hundesda *et al.* 2006). A maioria

destes vírus possuem baixas doses infecciosas, uma alta resistência e persistência no ambiente (Li *et al.* 1998c; Wiethoff *et al.* 2005). O risco de infecção por estes vírus quando o consumo de água contaminada é cerca de 10 a 10 000 vezes mais elevado em comparação com exposições semelhantes a bactérias patogénicas (Haas *et al.* 1993) e, sendo que esta contaminação pode ter origem em diversas fontes a presença destes vírus no ambiente é um problema atual de saúde pública. Tendo em conta todos os factos apresentados anteriormente é de extrema importância o desenvolvimento de sistemas eficazes de desinfecção de águas de modo a minimizar a ocorrência de surtos virais e, consequentemente, de baixas humanas.

1.1 Adenovírus

O adenovírus humano (HAdV) foi isolado pela primeira vez a partir de culturas de células de tecidos adenoides (Rowe *et al.* 1953). Atualmente, estão descritos pelo menos 88 tipos diferentes de HAdVs (Dhingra *et al.* 2019) classificados em sete espécies distintas (HAdV-A a HAdV-G), de acordo com as suas propriedades serológicas e sequências genómicas, todas pertencentes ao género *Mastadenovirus* da família *Adenoviridae* (HAdV Working Group; Jones *et al.* 2007; Seto *et al.* 2011; Robinson *et al.* 2013; Dhingra *et al.* 2019). A distribuição dos HAdVs em diferentes espécies reflete, em parte, os diferentes tropismos celulares e os sintomas e doenças resultantes da sua infecção: gastroenterites (HAdV-F e -G), pneumonias (HAdV-B, -C e -E), hepatites (HAdV-C), meningoencefalites (HAdV-A, -B e -D), cistites (HAdV-B) e ceratoconjuntivite (HAdV-D) (Lion 2014).

As exatas prevalência e incidência das infeções por HAdVs são desconhecidas, porque a maioria dos casos é visto por médicos de clínica geral e optometristas. Contudo, estima-se que as infeções por estes vírus representem cerca de 2 a 5% de todas as infeções respiratórias (Pond and World Health Organization. 2005). A maioria das epidemias em indivíduos imunocompetentes são observadas no inverno e no início da primavera, mas as infeções em indivíduos imunocomprometidos são registadas durante todo o ano (Mitchell *et al.* 2000; Ison 2006). Os dados epidemiológicos indicam que a maioria das infeções por HAdV ocorrem durante os primeiros 5 anos de vida, consequência da ausência de imunidade humoral. Nas crianças, as infeções por HAdV são responsáveis por cerca de 15% das infeções do trato respiratório superior e por cerca de 5% das infeções do trato respiratório inferior (Hong *et al.* 2001). Em indivíduos imunocompetentes, as infeções são maioritariamente ligeiras e não necessitam de tratamento, mas alguns casos podem ser severos e até fatais (Savón *et al.* 2008; Carr *et al.* 2011; Siminovich and Murtagh 2011). A transmissão destes vírus pode ser feita através de aerossóis, pela via fecal-oral e fónites contaminadas. Podem também ser transmitidos, de forma rara, pela exposição a secreções do canal cervical (Montone *et al.* 1995) durante o parto e em transplantes (Koneru *et al.* 1990). Após a infeção o período de incubação destes vírus pode variar entre 2 dias a 2 semanas, dependendo do tipo de HAdV e do modo como foi transmitido (Ison 2006). Os HAdVs podem também permanecer nos tecidos linfoides humanos, no parênquima renal, podendo ocorrer a sua reativação em indivíduos severamente imunossuprimidos (Garnett *et al.* 2002; Kojaoghlanian, Flomenberg and Horwitz 2003).

1.1.1. Estrutura do virião

Os HAdVs são vírus sem invólucro com cerca de 70-100 nm de diâmetro e que contêm um genoma linear de cadeia dupla de DNA envolvido por uma cápside proteica com uma simetria icosaédrica (20 faces triangulares, 30 arestas e 12 vértices) (Horne *et al.* 1959; Lion 2014; Flint *et al.* 2015).

De forma geral, o virião é constituído por 13 proteínas diferentes: hexão (II), *penton base* (III), IIIa, fibra (IV), IVa2, V, VI, VIII, IX, Mu, proteína terminal TP e protease 23K (Figura 1.1) (Russell 2009). A cápside viral é constituída por cerca de 7 das 13 proteínas referidas que podem ser divididas em dois grupos: *major capsid proteins* (II, III e IV) e *minor capsid proteins* (IIIa, VI, VIII e IX) (Vellinga, Van der Heijdt and Hoeben 2005). As restantes 6 proteínas localizam-se no *core* do virião, sendo que 5 (IVa2, V, VII, Mu e TP) estão associadas ao genoma viral e outra é a protease 23K que desempenha um papel vital na montagem do virião. As *minor capsid proteins* estão, sobretudo, envolvidas na estabilização e flexibilidade da cápside viral (Martín 2012). Historicamente, estas proteínas foram numeradas de II a IX de acordo com o aumento da sua mobilidade eletroforética em géis de poliacrilamida-SDS (Everitt *et al.* 1973; Chatterjee, Vayda and Flint 1985; van Oostrum and Burnett 1985).

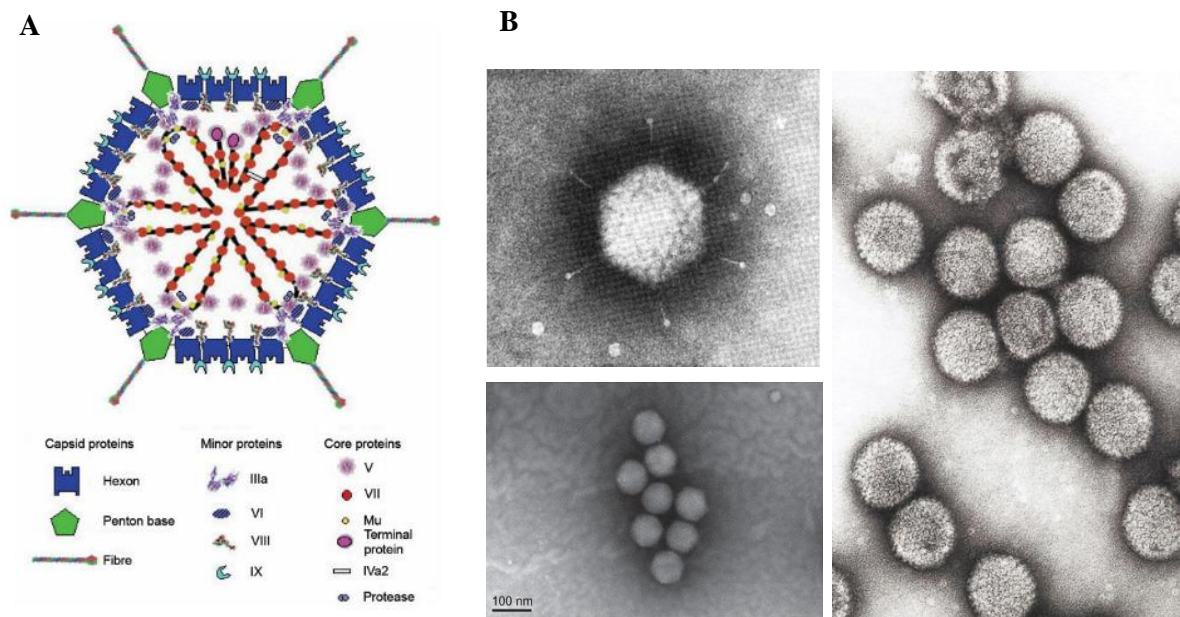


Figura 1.1- Estrutura do adenovírus. (A) Diagrama esquemático da estrutura proteica do adenovírus humano (Russell 2009). (B) Imagens de microscopia eletrónica de adenovírus (Valentine and Pereira 1965; Schnell *et al.* 2001; Li *et al.* 2013).

De forma mais concreta, a cápside viral é composta por 252 capsómeros, dos quais 240 são hexões homotriméricos presentes nas faces e arestas e 12 são proteínas *penton* (Horne *et al.* 1959; Norrby *et al.* 1976; van Oostrum and Burnett 1985) localizadas nos 12 vértices da estrutura icosaédrica. Em cada um destes vértices, cinco proteínas *penton base* (III) formam um capsómero que suporta uma proteína trimérica designada fibra (IV), que se projeta para o exterior do virião. Esta fibra é, por sua vez, composta por 3 domínios: o domínio distal *tail* (N-terminal), o domínio *shaft* (região intermédia) e o domínio *knob* (C-terminal). O domínio *tail* é o local de ligação à proteína *penton base*. O domínio *shaft* pode variar o seu tamanho consoante os vários tipos de HAdV, resultando em diferenças na flexibilidade da proteína fibra e, consequentemente, na interação desta com os recetores celulares. O domínio *knob* (C-terminal) permite a ligação do virião ao recetor primário da célula (Kirby *et al.* 1999; Santis *et al.* 1999).

1.1.2. Ciclo infeccioso

O adenovírus possui a capacidade de infectar uma grande variedade de células, quer estas se encontrem ou não em divisão (Yu 2013). O ciclo infeccioso do adenovírus pode ser dividido em duas fases. A primeira ou *early fase* (E) inclui a entrada do virião na célula hospedeira e a passagem do genoma viral para o interior do núcleo, seguida por uma transcrição seletiva e a tradução dos genes *early*. Estes eventos vão modular as funções celulares, facilitando a replicação do DNA viral e a resultante transcrição e tradução dos genes *late*. A segunda ou *late fase* (L) inclui a montagem de novas partículas virais e a sua libertação para o meio extracelular como consequência da lise celular.

A infeção tem início com a adsorção do virião à célula hospedeira através de uma ligação de alta afinidade entre o domínio *knob* da proteína fibra (IV) e o recetor celular (Chroboczek, Ruigrok and Cusack 1995; Kirby *et al.* 1999; Santis *et al.* 1999) [1]. Este recetor que é reconhecido pelo vírus pode variar de acordo com o tipo de HAdV (Nilsson *et al.* 2011; Wang *et al.* 2011). Contudo, a maioria dos HAdVs reconhece o *Coxsackie Adenovirus Receptor* (CAR), como é o caso dos HAdVs dos tipos 2 e 5 pertencentes à espécie HAdV-C (Bergelson 1997).

Após esta interação inicial, o virião entra na célula através de uma endocitose mediada por vesículas de clatrina (Wang *et al.* 1998) [2]. A endocitose do virião é permitida pela interação do *motif* RGD exposto da proteína *penton base* (III) (Stewart *et al.* 1997) com as *av* integrinas celulares (Wickham *et al.* 1993) [3]. Esta interação induz uma variedade de respostas celulares, e.g. ativação da cinase PI3 (Li *et al.* 1998b) e das GTPases Rho (Li *et al.* 1998a), importantes na alteração do citoesqueleto celular para a facilitação da internalização do virião. Uma vez no interior do endossoma, o virião encontra um ambiente de baixo pH e inicia o processo de disrupção da sua cápside através da ativação da proteína VI. Esta disrupção faz com que as proteínas fibra e *penton base* se dissociem da cápside e atuem na desintegração da membrana do endossoma, libertando o virião parcialmente desmontado para o citosol da célula (Prchla *et al.* 1995) [4]. Este virião parcialmente desmontado é então transportado para o invólucro nuclear e o seu genoma passa, através dos poros nucleares, para o interior do núcleo [5]. No núcleo, a proteína terminal (TP) liga-se aos componentes nucleares da matriz de forma a estimular a transcrição, replicação do DNA e a montagem de novos viriões [6-20]. Após a montagem dos novos viriões estar concluída, estes são libertados para o meio extracelular através da lise celular despoletada pela *adenovirus death protein* (ADP) [21,22] (Tollefson *et al.* 1996) (Figura 1.2).

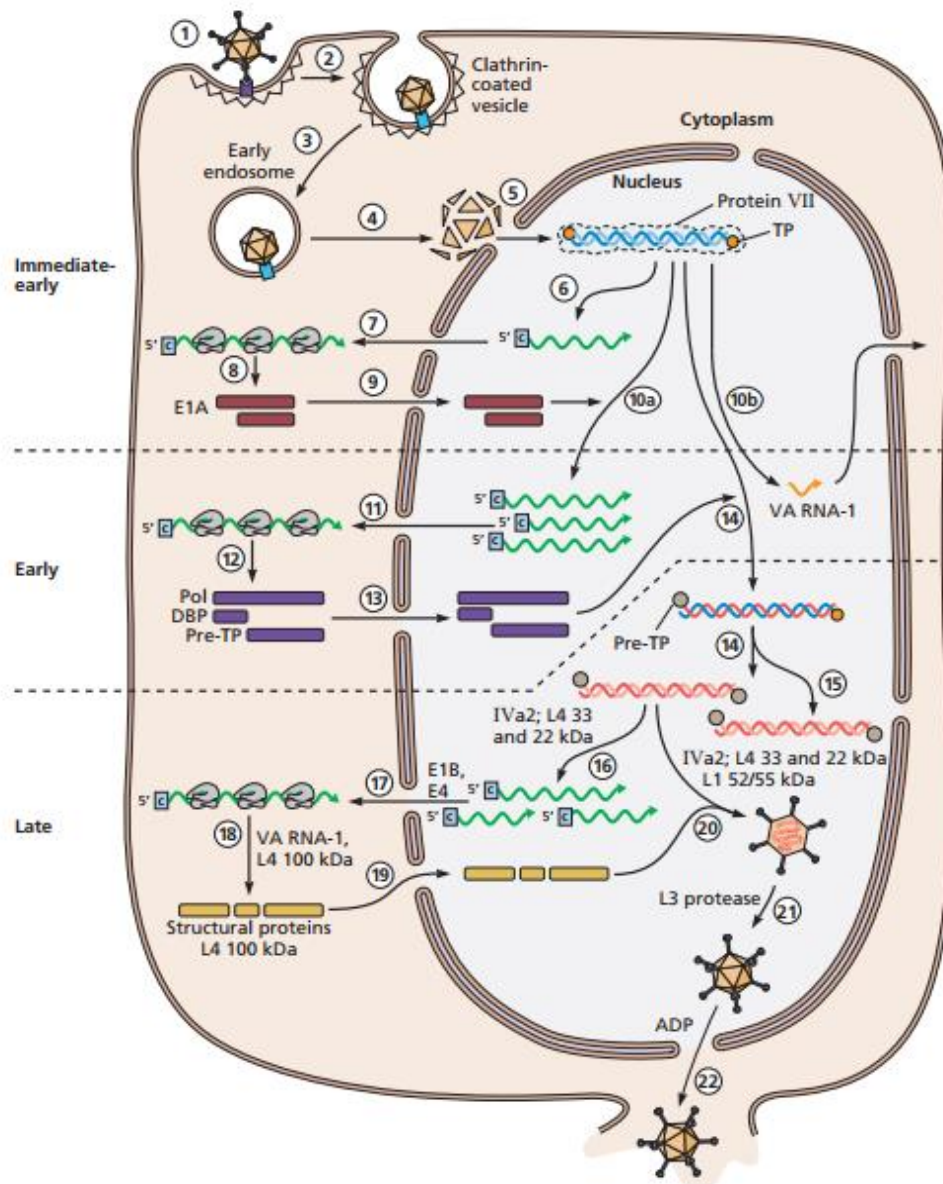


Figura 1.2- Ciclo infeccioso do adenovírus humano. [1] Adsorção do vírus a uma célula humana através da interação da proteína fibra com o recetor coxsackie-adenovírus (CAR) na superfície da célula (cilindro roxo). [2] Entrada da partícula viral através de endocitose mediada por vesículas de clatrina. [3] Interação da proteína penton com integrinas celulares (cilindro azul). [4] Desmontagem parcial da partícula viral antes de esta entrar em contacto com o citoplasma pela ação de uma região da proteína VI. [5] Importação do genoma viral associado à proteína core VII. [6] Transcrição do gene E1A pela polimerase de RNA tipo II da célula hospedeira. [7,8] Splicing alternativo e exportação dos mRNAs sintetizados a partir da transcrição de E1A, seguido da síntese das proteínas codificadas pelo gene E1A pela maquinaria celular. [9] Transporte destas proteínas para o núcleo, no qual vão regular a transcrição dos genes virais e dos genes celulares. [10a] Transcrição dos genes virais early pela polimerase de RNA tipo II estimulada pela proteína maior codificada pelo gene E1A. [10b] Transcrição dos genes VA pela polimerase de RNA tipo II [11,1] Processamento, exportação e tradução dos pré-mRNAs early. [13] Importação destas proteínas early para o núcleo. [14] Cooperação das proteínas de replicação viral com um número limitado de proteínas celulares para a síntese de DNA viral. [15,16] As moléculas de DNA viral replicadas podem servir de moldes para futuros ciclos de replicação ou para a transcrição dos genes late. Alguns promotores late são ativados apenas pela replicação do DNA viral, mas a transcrição da major late transcription unit (MLTU) necessita das proteínas IVa2 e L4. [17] Exportação dos late mRNAs processados do núcleo para o citoplasma. [18] Tradução destes late mRNAs. [19] Importação destas proteínas para o núcleo. [20] Montagem das cápsides, formando partículas virais imaturas não infecciosas. [21] Formação de viriões. [22] Saída dos viriões da célula, após a destruição da célula hospedeira com o auxílio da proteína E3 adenovirus death protein (ADP) (Flint et al. 2015).

1.1.3. Organização e expressão do genoma viral

O genoma do HAdV é constituído por uma dupla cadeia linear de DNA cujo tamanho varia, normalmente, entre os 34 e 36 kpb (Robinson *et al.* 2013). Este genoma linear possui *inverted terminal repeats* (ITRs) em ambas as extremidades que, por sua vez, contêm as origens de replicação virais (Hay *et al.* 1995). As extremidades 5' do genoma viral estão covalentemente ligadas a uma proteína terminal (TP) (Rekosh *et al.* 1977) (Figura 1.3).

A transcrição do genoma viral é efetuada pela polimerase de RNA tipo II da célula hospedeira em três fases: *immediate early* (IE), *early* (E) e *late* (L). Estas englobam no total oito unidades transcricionais: *immediate early* (IX e IVa2), *early* (E1A, E1B, E2, E3 e E4) e *late* (MLTU, *major late transcription unit*). Esta MLTU processa 5 transcritos (L1, L2, L3, L4 e L5). Para além destas unidades, existem ainda VA RNAs que são transcritos pela polimerase de RNA tipo III celular, mas que não são traduzidos. Estes estão envolvidos no combate aos mecanismos de defesa da célula hospedeira (Russell 2000).

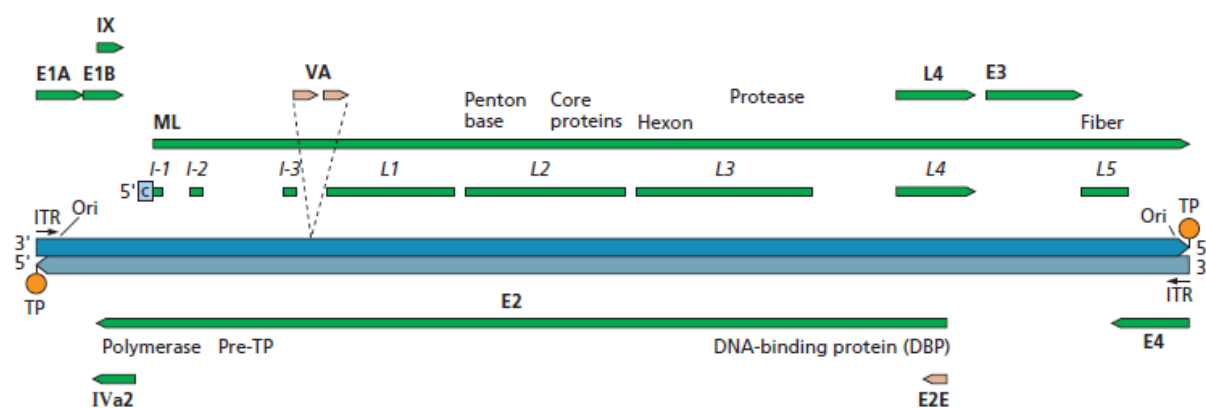


Figura 1.3- Organização do genoma do adenovírus humano tipo 5. As setas representam a organização e o sentido da transcrição das unidades early (E1A, E1B, E2, E3 e E4), intermediárias (IX e Iva2) e late (ML). As setas verdes e laranjas representam os produtos primários da transcrições efetuadas pelas polimerases de RNA do tipo II e III, respetivamente (Flint et al. 2015).

Os genes *early*, designados E1 a E4, são necessários para a replicação viral. A unidade transcricional E3 é altamente divergente entre as várias espécies de HAdVs e codifica proteínas que estão associadas à modulação da resposta imunitária da célula hospedeira. Os genes *late* são transcritos através do *major late promotor* (MLP), originando a *major transcripton unit* (MLTU). Esta MLTU vai sofrer processamento seguido de *splicing* dando, por sua vez, origem aos transcritos L1-L5. As proteínas produzidas por estes transcritos são os componentes estruturais (proteínas da cápside e do *core*) e proteínas “*helper*” (52/55K, protease 23K, 100K e 33K) que vão ser transportadas para o interior do núcleo para que possam ser feitas a montagem, a encapsidação e a maturação das novas partículas virais. As proteínas estruturais mais importantes são a hexão (II), a *penton base* (III) e a fibra (IV) que são codificadas pelas regiões L2, L3 e L4, respetivamente (Figura 1.4).

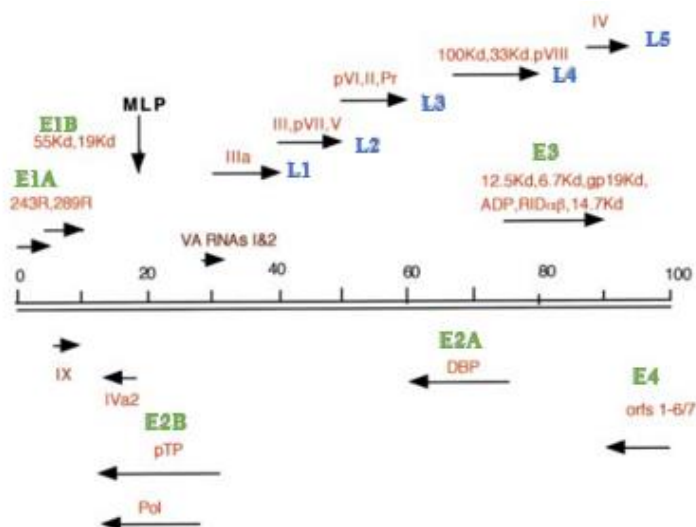


Figura 1.4- Transcrição do genoma do adenovírus. Os transcritos early estão escritos a cor verde e os late a azul. As setas indicam a orientação da transcrição. Os VA RNAs estão escritos a castanho. MLP, Major Late Promoter (Russell 2000).

1.1.4. Impacto e relevância

O adenovírus é reconhecido mundialmente como o vírus entérico mais prevalente nas águas, devido à sua elevada estabilidade e persistência nestes ambientes, o que pode causar sérias implicações a nível da saúde pública (Aslan *et al.* 2011; Rodríguez-Lázaro *et al.* 2012; Bosshard *et al.* 2013).

O HAdV pode ser infeccioso a baixas concentrações e está classificado pela OMS como um dos agentes patogénicos virais, de alta significância, transmitidos por águas (WHO 2011). Os adenovírus têm sido responsáveis por vários surtos relacionados com uso recreativo de águas, principalmente em piscinas, mais do que qualquer outro vírus detetado em ambientes aquáticos (Gerba, CP; Enriquez 1997). Estima-se que o risco de infeção anual por adenovírus em águas de uso recreativo seja cerca de 1/1000 em apenas uma exposição (Crabtree *et al.* 1997). Também já foram associados surtos de adenovírus ao consumo de águas contaminadas (Kukkula *et al.* 1997; Divizia *et al.* 2004).

A recombinação entre tipos diferentes de HAdVs é frequente e pode constituir um problema grave de saúde pública, na medida em que a variedade e o número destes agentes infecciosos tende a aumentar (Hashimoto *et al.* 2018). Estes novos tipos podem ter um risco acrescido devido à sua imprevisibilidade clínica e difícil deteção.

O interesse nos HAdVs tem vindo a aumentar sobretudo por dois fatores: i) as infeções persistentes por este vírus têm sido cada vez mais associadas à mortalidade em adultos e crianças imunocomprometidos sujeitos a transplantes de células estaminais; ii) os vetores de HAdVs têm demonstrado ser uma ferramenta eficiente de transferência génica usada clinicamente. Atualmente, são bastante utilizados em vacinas contra antígenos tumorais e, mais recentemente, estão a ser testadas vacinas HAdV-based para vários agente infecciosos como a tuberculose, HIV e ébola (Ghebremedhin 2014; Mennechet *et al.* 2019).

1.2. Métodos de desinfecção de adenovírus

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA), os tratamentos de desinfecção utilizados para a desinfecção de águas de consumo têm de cumprir uma remoção de cerca de 99,99% (decréscimo de 4 log UFP/mL da carga viral) de vírus entéricos (US EPA 2004). Apesar desta recomendação, os processos convencionais de tratamento de efluentes apenas conseguem remover cerca de 50-90% destes vírus, permitindo que uma significativa carga viral seja libertada para o meio ambiente (Cloete, Silva and Nel 1998).

Os métodos de tratamento de águas mais utilizados mundialmente incluem a remoção física dos agentes patogénicos através de sistemas de filtração e a sua inativação através da utilização da radiação UV ou compostos químicos como o cloro, cloraminas, ozono e dióxido de cloro. Contudo, a remoção por filtrações tem demonstrado ser ineficaz devido ao seu tamanho bastante reduzido (Gall *et al.* 2015). A desinfecção através da utilização de cloro é a mais utilizada mundialmente (Crittenden and Montgomery Watson Harza (Firm) 2012). A maioria dos vírus são inativados pelo uso de cloro, dióxido de cloro e de ozono porém, estes compostos podem levar à produção de subprodutos tóxicos de desinfecção (DBPs) (US EPA 2006), que são prejudiciais ao meio ambiente, trabalhadores e consumidores. O uso de monoclорamina e da radiação UV monocromática (~254 nm) e policromática (200-300 nm) são alternativas de tratamento de forma a controlar a formação dos DBPs. O adenovírus apesar de ser suscetível ao cloro está descrito como sendo altamente resistente quer à monoclорamina quer à radiação UV (Sirikanchana, Shisler and Mariñas 2008).

A radiação ionizante surge como uma tecnologia alternativa na inativação destes agentes patogénicos, de forma a assegurar a qualidade das águas. A irradiação por feixe de eletrões define-se pela exposição a um feixe de eletrões acelerados de alta energia (tipicamente entre os 3 e 12 MeV). Este tipo de radiação ionizante tem uma penetração mais baixa do que a radiação gama (3 a 10 cm, dependendo da voltagem, do acelerador e densidade do material irradiado) mas o tempo de tratamento da amostra é muito mais reduzido devido ao débito de dose mais elevado (dose absorvida por unidade de tempo) (Mark Plavsic 2015).

A inativação viral pela radiação ionizante ocorre por duas vias: direta e indireta. A via direta envolve o ataque direto da radiação às macromoléculas (nucleótidos, ribonucleótidos e de forma menos direta nas proteínas) como modo predominante de ação. A via ou efeito indireto envolve a produção de radicais livres de oxigénio (especialmente o radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio), através da radiólise da água, que vão reagir também com as macromoléculas mencionadas anteriormente.

De uma forma geral, a radiosensibilidade dos microrganismos é proporcional ao seu tamanho e à sua complexidade. Um alvo de maiores dimensões (fungos ou bactérias) é mais sensível à radiação ionizante do que um de menor dimensão (vírus) (International Consultative Group on Food Irradiation (ICGFI) 1995). A inativação dos microrganismos pela radiação ionizante vai depender também do tipo de energia, do débito de dose e da dose absorvida. A dose de radiação absorvida é medida em Gray (Gy) de acordo com o Sistema Internacional de Unidades ou em quilo Gray (kGy), sendo que um gray equivale a absorção de um joule de energia por quilograma (J/kg) Para além destas variáveis a constituição do meio, a temperatura, conteúdo em água da célula, idade dos microrganismos e presença de oxigénio são igualmente fatores que influenciam a sensibilidade do microrganismo face à irradiação (Hernigou *et al.* 2000; Espinosa *et al.* 2012; Ferreira, Antonio and Cabo Verde 2017).

As tecnologias de radiação ionizante, nomeadamente a irradiação por feixe de eletrões, já foi descrita como eficaz na desinfecção viral em alimentos (especialmente em vegetais, bivalves e aves) e em pequenos volumes de líquido (Preuss *et al.* 1997; Brahmakshatriya *et al.* 2009; Praveen *et al.* 2013;

Predmore *et al.* 2015). Contudo, os mecanismos virucidas desta tecnologia não são ainda bem compreendidos e ainda não existe literatura que detalhe o seu efeito na inativação de HAdVs.

Os vírus entéricos como os HAdVs têm um papel e uma representatividade significativa na contaminação ambiental, contudo os métodos de tratamento de efluentes nem sempre são eficientes na remoção deste tipo de agentes patogénicos. O adenovírus humano tipo 5 (HAdV-5) está descrito como um dos tipos mais comuns mundialmente sendo por isso, um bom modelo para estudar os mecanismos virucidas de adenovírus humano por tratamentos de desinfecção alternativos como o feixe de eletrões.

1.3. Objetivo

Esta dissertação de mestrado teve como principal objetivo o estudo dos mecanismos virucidas da irradiação por feixe de eletrões em adenovírus humanos. A metodologia utilizada focou-se nos efeitos da radiação no genoma e nas proteínas constituintes do adenovírus humano como também na sua infeciosidade. Os efeitos nos diferentes componentes do adenovírus e na sua capacidade infecciosa foram avaliados em dois substratos diferentes, nomeadamente em tampão fosfato-salino (PBS) e em efluente doméstico, de forma a mimetizar possíveis cenários onde a radiação ionizante possa ser utilizada como ferramenta de desinfecção contra vírus entéricos (e.g. desinfecção de água de consumo e tratamento de efluentes). As conclusões deste estudo podem ser, sobretudo, um contributo importante para o desenvolvimento de processos alternativos de desinfecção de efluentes ou um complemento aos tratamentos tradicionais. Para além desta aplicação, o conhecimento adquirido acerca dos mecanismos virucidas pode contribuir para o desenvolvimento de outras utilizações de vírus inativos ou atenuados como vetores de fármacos e vacinas. Para além da irradiação por feixe de eletrões foram testados mais dois tipos de tratamento, autoclavagem e radiação UV, de forma a comparar esta tecnologia emergente com dois métodos de desinfecção já utilizados.

Este projeto vai ao encontro do cumprimento dos objetivos de desenvolvimento sustentável estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU), nomeadamente na gestão sustentável de águas e saneamento para todos.

2. Material e métodos

2.1 Vírus e linha celular

O adenovírus humano tipo 5 (HAdV-5; ATCC VR-1516) foi propagado em cultura aderente de células epiteliais de carcinoma de pulmão humano A549 (ATCC CCL-185). As células A549 foram cultivadas e mantidas a 37 °C sob uma atmosfera de CO₂ a 5%, em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Hyclone, Gel Life Sciences, Logan, Utah) suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% (Hyclone, Gel Life Sciences, Logan, Utah), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 1 mM de piruvato de sódio e 0,01 M de tampão HEPES. Para a infecção das células A549 com o vírus HAdV-5 é utilizado o mesmo meio DMEM, mas suplementado com FBS a 2%.

2.2 Produção e titulação de stock viral

Os stocks virais de HAdV-5 foram obtidos através da infecção de células A549 com uma multiplicidade de infecção (MOI, *Multiplicity Of Infection*) de 0,1. Após 90 minutos de incubação a 37 °C e sob uma atmosfera de CO₂ a 5%, o inóculo viral foi removido e foi adicionado meio DMEM suplementado com FBS a 2%. Após 7 dias de infecção, os vírus foram recolhidos após 3 ciclos de congelamento e descongelamento seguidos de uma centrifugação do meio da cultura, a 3000 rpm (Beckman J2-21M, rotor J20-1) durante 30 minutos a 18 °C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi armazenado a -80 °C.

Os títulos dos stocks virais e das amostras de HAdV-5 irradiadas, não tratadas, autoclavadas (121 °C a 1 atm durante 15 minutos) e expostas à radiação UV (~254 nm durante 15 minutos) foram determinados através da técnica de ensaio em placa, utilizando a linha celular A549. As células A549 foram semeadas em placas de 60 mm a uma concentração de 1 x 10⁵ células/mL e incubadas a 37 °C e sob uma atmosfera de CO₂ a 5% até atingirem uma confluência de 60-80%. Após remoção do meio de cultura, foi adicionado a cada placa um inóculo de 300 µL, constituído por uma das diluições seriadas da amostra a titular. No caso das amostras irradiadas às doses mais elevadas 19-20 kGy e tratadas por autoclave foi utilizado um inóculo viral de 500 µL não diluído. Foram feitos duplicados para cada amostra. As placas foram incubadas durante 1 hora a 37 °C sob uma atmosfera de CO₂ a 5%, com suave agitação a cada 15 minutos. Após este período, o inóculo foi removido e a monocamada celular foi coberta com uma camada de 3 mL de meio *Minimum Essential Media* (MEM; Corning, Manassas, USA) suplementado com FBS a 2% e com agarose a 0,5%. Após 2 e 7 dias da infecção, foram adicionadas novas camada de 1,5 mL de MEM FBS a 2% e agarose a 0,5%. A terceira camada continha a mesma composição à qual foi adicionada vermelho neutro (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 1%. As placas virais foram contadas entre 8 a 24 horas após a adição da última camada e o título viral foi determinado pela seguinte equação:

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{nº de placas contadas}}{\text{volume do inóculo (mL)} \times \text{diluição}} \quad (2.1)$$

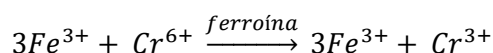
O título viral foi expresso em logaritmo decimal de unidades formadoras de placas por mililitro (log UFP/mL).

2.3 Preparação das amostras e caracterização dos substratos

As amostras de HAdV-5 (5 mL) a submeter ao tratamento por feixe de eletrões foram preparadas por diluição do stock viral (10^9 UFP/mL) em PBS (CQO de < 50 mg O_2 /L) em dois efluentes domésticos diferentes, de forma a atingir uma concentração final de aproximadamente 10^7 UFP/mL. Para fins comparativos, foram igualmente preparadas amostras equivalentes para submeter a tratamentos por autoclavagem (121°C a 1 atm durante 15 minutos) e radiação UV (~ 254 nm durante 15 minutos). Os dois efluentes domésticos utilizados como substrato foram recolhidos antes do tratamento terciário em duas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), uma localizada no Barreiro (CQO 76 mg O_2 /L) e outra no Campo Militar de Santa Margarida (CQO 57 mg O_2 /L). Ambos os efluentes foram autoclavados antes de serem utilizados na preparação das amostras a submeter aos vários tratamentos.

A composição do substrato, nomeadamente o seu conteúdo em matéria orgânica, é um fator abiótico que influencia a inativação microbiana. Desta forma, a carga orgânica dos substratos estudados (PBS e dois efluentes domésticos) foi avaliada através do parâmetro Carência Química de Oxigénio (CQO), que determina a quantidade de matéria orgânica presente na amostra suscetível de ser oxidada quimicamente. A amostra (1,25 mL) é tratada com um excesso de mistura cromo-sulfúrica (0,75 mL de dicromato de potássio 40 mM e 1,75 mL de sulfato de prata em ácido sulfúrico a 10 g/L) e submetida a aquecimento (148°C) em refluxo até ocorrer a oxidação da matéria orgânica. Após esta digestão (3 horas), o dicromato de potássio que não reagiu foi titulado com sulfato de amónio ferroso (FAS) 0,12 M, sendo a matéria oxidável calculada em equivalentes de oxigénio.

A oxidação dos compostos orgânicos resulta na redução de Cr^{6+} para Cr^{3+} :



Este método é realizado recorrendo ao Termo reator HI839800 (Hanna Instruments, Limena, Itália). As amostras dos efluentes analisadas, foram inicialmente diluídas 10 vezes em água ultrapura e feitas três réplicas de cada uma para garantir a fiabilidade/reprodutibilidade da análise.

O cálculo da CQO, em mg de O_2 por litro de amostra, é efetuado com base na seguinte equação:

$$CQO = \frac{(A-B) \times M \times 8000}{\text{volume}_{\text{amostra}}} \quad (2.2)$$

Em que:

A \rightarrow Volume de FAS usado na amostra de branco (mL)

B \rightarrow Volume de FAS usado na amostra (mL)

M \rightarrow Massa molecular de FAS

8000 \rightarrow Miliequivalentes em peso de $O_2 \times 1000$ (mL.L^{-1})

2.4 Processo de irradiação por feixe de elétrons

As amostras foram irradiadas num acelerador linear de elétrons (LINAC Saturne 41, GE Healthcare, Chicago, EUA) com uma energia de 10 MeV, localizado no Campus Tecnológico e Nuclear do Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa (Bobadela, Portugal). As irradiações foram efetuadas à temperatura ambiente, a uma gama de doses entre 3 e 21 kGy e um débito de dose de 25 kGy/h. As amostras (5 mL) dos três substratos (PBS e efluentes) foram irradiadas em frascos para cultura celular T-25. As doses absorvidas foram estimadas através de dosímetros radiocrômicos calibrados FWT-60 (Far West Technology, Inc., Goleta, EUA). Como controlo foram utilizadas amostras não tratadas. As irradiações foram efetuadas em triplicado.

2.5 Extração de DNA viral e PCR

O DNA genómico viral foi extraído a partir das amostras de HAdV-5 (tratadas por feixe de elétrons, radiação UV, esterilização em autoclave e amostras não tratadas), usando o PureLink Viral RNA/DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. De forma breve, foi utilizado um volume de 200 µL das amostras não tratadas e tratadas para a extração do DNA. Os ácidos nucleicos purificados foram eluídos em 25 µL de água sem RNase/DNase e foram armazenados a -20 °C até ser efetuada a reação de PCR. Nas duas reações de PCR foi utilizado o mesmo *primer forward* AD For178 combinado com os *primers reverse* AD Rev189 e AD Rev278 (Tab. 2.1) com o objetivo de amplificar dois fragmentos de tamanhos distintos, 1 kpb e 10 kpb, respetivamente (Figura 2.1 e 2.2).

Foram feitas duas misturas de reação diferentes de PCR, uma delas para amplificar o fragmento de 1 kpb e outra para o de 10 kpb. Para a amplificação do fragmento de menor dimensão a reação foi efetuada num volume de 25 µL, contendo água, tampão com MgCl₂ a 1,76 mM, 10 µM de cada *primer*, dNTP mix a 0,64 mM, DMSO a 7%, formamida a 5%, 2 U de HotBegan™ Hot Start Taq DNA Polymerase (Canvax, Córdoba, Espanha) e 5 µL de DNA viral. A mistura de reação utilizada para amplificar o fragmento de maior dimensão era idêntica à anterior, mas continha 8 µL de DNA viral. As condições do PCR foram as seguintes: desnaturação inicial de 95 °C durante 90 segundos, seguida por 15 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 15 segundos e *annealing*-extensão a 65 °C durante 10 min, finalizando com um ciclo de extensão final a 72 °C durante 10 minutos. As amplificações foram efetuadas num termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com gel red (Biotium, Hayward, CA, USA) a 90 V durante 2 horas e visualizados num transiluminador de UV (Alpha Innotech, Califórnia, EUA). O marcador de massa molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA ladder (Termo Fisher Scientific™, Massachusetts, EUA) foi utilizado para estimar o tamanho dos produtos amplificados.

Tabela 2.1- Primers utilizados no PCR. A tabela contém a indicação da orientação, dimensão, sequência, conteúdo em GC (%), temperatura de melting (T_m), posição no genoma de adenovírus humano tipo 5 (GenBank KX868466.2) e tamanho dos fragmentos amplificados (Rodríguez, Bounty and Linden 2013).

Nome	Orientação	Dimensão	Sequência	Conteúdo GC (%)	T_m (°C)	Posição	Tamanho Frag. (pb)
AD For178	Forward	20	5'- CGG CGG TAT CCT GCC CCT CC-3'	75	65,2	17 811– 17 830	
AD Rev189	Reverse	28	5'- CGT AGG TGC CAC CGT GGG GTT TCT AAA C-3'	57,1	64,3	18 986– 18 959	1175
AD Rev278	Reverse	29	5'- CGC TCT GCC TCT CCA CTG GTC ATT CAG TC-3'	58,6	65	27 859– 27 844	10048

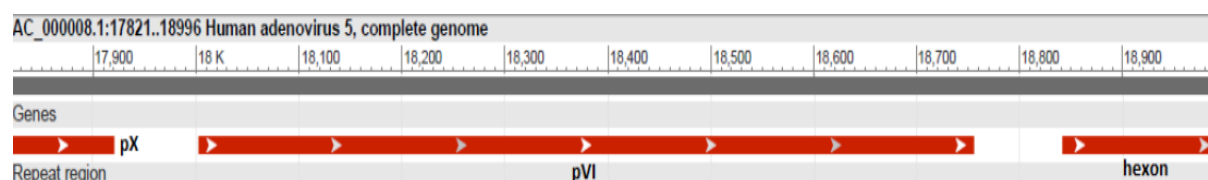


Figura 2.1- Região codificante do fragmento de tamanho 1 kpb. Este fragmento contém o gene codificante da proteína VI e porções dos genes que codificam as proteínas X e hexão (II) (Brister et al. 2015)

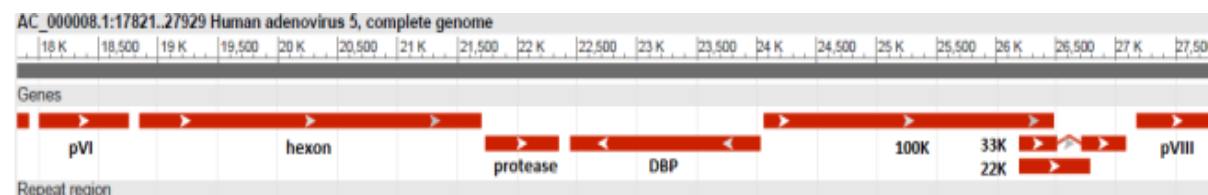


Figura 2.2- Região codificante do fragmento de tamanho 10 kb. Esta região contém os genes codificante das proteínas pVIII, pVI, hexão (pII), protease (23K), 100K, 33K, 22 K e DBP (Brister et al. 2015)

2.6. Análise das proteínas virais por SDS-PAGE

Esta análise foi feita usando um gel de concentração e um gel de resolução com concentrações de poli-acrilamida de 4 e 12,5%, respectivamente. O gel de resolução tinha a seguinte constituição: acrilamida/Bis-acrilamida (Sigma, St. Loius, MO, USA) a 12,5%, tris base (pH 8,8; Fisher Bioreagents, Geel, Bélgica) a 0,75 M, dodecilsulfato de sódio (SDS; Calbiochem, Sigma, St. Loius, MO, USA) a 0,1%, TEMED (Sigma, St. Loius, MO, USA) a 0,16%, e persulfato de amônio (Sigma, St. Loius, MO, USA) a 0,066%. O gel de concentração continha acrilamida/Bis-acrilamida a 4%, tris base (pH 6,8) 0,1 M, SDS a 0,08%, TEMED a 0,1% e persulfato de amônio a 0,05%. Os géis foram colocados numa câmara própria pré montada (Bio-Rad Laboratories, California, EUA). O pente foi imediatamente adicionado e o gel foi deixado a polimerizar. Após a polimerização estar concluída, o pente foi retirado do gel e a câmara foi inserida no Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, California, EUA). Este foi preenchido com tampão de corrida [tris base (pH 6,8) a 0,25 M, glicina a 1,92 M e SDS a 1%].

As amostras de proteínas virais foram preparadas por adição de 20 µL de amostra viral a 20 µL de tampão Laemmli [SDS a 4%, β-mercaptoetanol (BDH Chemielas, VWR, Pensilvânia, EUA) a 10%, Tris-HCL (pH 6,8) a 125 mM, azul de bromofenol (Difco, Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 0,5 mg/mL e glicerol (Riedel-de-Haën, Honeywell, Carolina do Norte, EUA) a 20%]; esta mistura foi fervida durante 4 minutos e as amostras resultantes foram aplicadas no gel de poliacrilamida juntamente com o marcador de massa molecular NZYBlue Protein Marker (Nzytech, Lisboa, Portugal). O gel foi corrido a uma corrente constante de 100 V durante 90 minutos. Depois de desmontados, os géis foram incubados *overnight* com o corante BlueSafe (Nzytech, Lisboa, Portugal), para a visualização do perfil dos polipéptidos.

2.7. Western-blotting

Seguidamente à separação dos polipéptidos por SDS-PAGE, estas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, usando o método descrito a seguir. Montou-se uma cassette de transferência que continha as seguintes camadas: uma esponja, um papel de filtro mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, California, EUA), uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories, California, EUA), o gel de SDS-PAGE com os polipéptidos analisados por eletroforese, outro papel de filtro mini Trans-Blot e outra esponja. Todos estes componentes foram pré-imersos em tampão de transferência, contendo metanol a 20% (v/v), glicina a 0,19 M e tris base a 0,02 M. A cassette de transferência foi colocada numa tina de transferência Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, California, EUA), que se preencheu com tampão de transferência e a transferência foi efetuada durante 90 minutos com uma amperagem constante de 400 mA. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada com tampão fosfato-salino com Tween-20 [PBST; Tween 20 a 0.1% (v/v) em PBS 1x] e saturada com uma solução bloqueadora (leite magro a 5% em PBST) *overnight* a 4 °C. A membrana foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente em constante agitação, com o anticorpo primário policlonal IgG *goat* anti-adenovírus (0151-9004, Bio-Rad Laboratories, California, EUA), diluído a 1/100 na solução bloqueadora. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBST durante 10 minutos também sob constante agitação. Seguidamente, a membrana foi incubada durante 55 minutos à temperatura ambiente e em constante agitação, com um anticorpo secundário igG *rabbit anti-goat* (STAR 122P, Bio-Rad Laboratories, California, EUA), diluído 1/1000 na solução bloqueadora. A membrana foi depois lavada com PBST durante 10 minutos para remover os anticorpos que não se ligaram. A deteção colorimétrica dos polipéptidos virais foi efetuada através de kits de amplificação (170-8230, Bio-Rad Laboratories, California, EUA) e de substrato (1708235, Bio-Rad Laboratories, California, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os tamanhos dos polipéptidos foram comparados com o marcador NZYBlue Protein Marker (Nzytech, Lisboa, Portugal).

2.8. ELISA

De forma a realizar o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) foi utilizado o *kit* Ridascreen adenovírus (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Este ensaio utiliza anticorpos monoclonais que reconhecem e se ligam às proteínas hexôno específicas da cápside do adenovírus. As amostras de HAdV-5 suspensas em PBS e em efluente foram analisadas num volume inicial de 100 µL, pela técnica de ELISA. Cada amostra foi testada em duplicado. A absorvância foi medida por um leitor de microplacas, EZ Read 800 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), a 405 nm, usando 620 nm como referência. A percentagem de ligação relativa foi inferida através $[x/y]*100$. Onde x é o valor de absorvância da amostra tratada e y o valor de absorvância da amostras não tratada.

3. Resultados e discussão

Este estudo teve como foco principal a análise dos efeitos da irradiação por feixe de elétrons em amostras de HAdV-5 suspensas em dois substratos aquosos distintos (PBS e efluente doméstico). Esta análise baseou-se nos resultados obtidos pela aplicação de quatro métodos: *western-blotting*, ELISA, PCR e ensaio em placa. Em todos os ensaios realizados foram ensaiadas suspensões virais, nos dois substratos referidos, tratadas por irradiação por feixe de elétrons (a doses entre 3 e 21 kGy), por radiação UV (254 nm durante 15 minutos) e pela combinação da temperatura e pressão (autoclavagem, 121 °C a 1 atm durante 15 minutos) de forma a fazer uma comparação entre estes métodos de desinfecção, já implementados, e a irradiação por feixe de elétrons. Foram utilizados dois substratos diferentes de forma a avaliar a potencial influência que a composição, em matéria orgânica, pudesse ter no comportamento do HAdV-5 face à irradiação. A carga orgânica presente numa amostra suscetível de ser oxidada quimicamente é determinada pelo cálculo de um parâmetro designado carência química de oxigénio (CQO). O PBS foi escolhido como substrato por ser uma solução neutra, semelhante à água, e que apresenta baixos níveis de carga orgânica ($CQO < 50 \text{ mg O}_2/\text{L}$). Estes baixos valores de CQO previnem o eventual *scavenging* dos radicais livres provenientes da radiólise da água e, consequentemente, a proteção do HAdV-5 dos efeitos indiretos da radiação ionizante. Foram utilizados dois efluentes de origens distintas, um proveniente do Barreiro ($CQO 76 \text{ mg O}_2/\text{L}$) e outro do Campo Militar de Santa Margarida ($CQO 57 \text{ mg O}_2/\text{L}$). Apesar destes efluentes apresentarem valores de COD diferentes, esta diferença não é considerada significativamente diferente, pelo que os resultados apresentados são produto da média dos resultados obtidos com cada um dos efluentes. De forma geral, o efluente ($CQO 76 - 57 \text{ mg O}_2/\text{L}$) foi utilizado na tentativa de reproduzir um possível cenário onde a irradiação por feixe de elétrons possa ser aplicada como uma ferramenta de desinfecção contra vírus entéricos humanos.

3.1. Análise do efeito da irradiação por feixe de elétrons nas proteínas virais

A potencial alteração na abundância/integridade das proteínas que constituem as partículas virais de HAdV-5, após a aplicação dos vários tratamentos, foi analisada com recurso a ensaios de *western-blotting* e de ELISA.

O ensaio de *western-blotting* utiliza anticorpos policlonais anti-adenovírus que reconhecem e se ligam às proteínas do vírus. Este ensaio teve como objetivo a determinação da antigenicidade das várias proteínas que constituem o HAdV-5, em amostras virais suspensas em PBS e em efluente, submetidas aos vários tratamentos. Esta determinação é feita de uma forma qualitativa pela amplificação do sinal emitido pela ligação dos anticorpos policlonais às proteínas do vírus. As suspensões virais foram irradiadas por feixe de elétrons a uma gama de doses compreendida entre os 3 e os 21 kGy.

A Figura 3.1 ilustra os resultados mais representativos dos perfis de polipéptidos, obtidos por *western-blotting*, das suspensões de HAdV-5 em PBS (Figura 3.1A) e em efluente (Figura 3.1B) nas diferentes condições de tratamento e no controlo (amostra não tratada). Observando a figura verifica-se que existe uma diminuição gradual na intensidade das bandas dos perfis de polipéptidos com o aumento da dose de radiação aplicada, independentemente do tipo de substrato utilizado.

Os perfis de polipéptidos correspondentes às suspensões virais irradiadas às doses de 3 e 5 kGy, em ambos os substratos, assemelham-se aos perfis das amostras não tratadas (Figura 3.1A e 3.1B). Estes perfis contêm três bandas que correspondem, de acordo com a massa molecular estimada, às proteínas hexão (II), *penton base* (III) e fibra (IV) de 108, 63 e 62 kDa, respetivamente. Esta semelhança de perfis,

entre as amostras irradiadas e as amostras não tratadas, indicam que estas doses de radiação não sejam suficientes para induzir alterações detetáveis nestas proteínas. Para além disto, estes resultados sugerem que o tipo de substrato utilizado parece não ter influência na alteração das proteínas virais, aquando a aplicação destas doses. Contudo, os perfis de polipéptidos correspondentes às suspensões virais irradiadas à dose de 13 kGy, em ambos os substratos, apresentam algumas diferenças em relação ao perfil das amostras não tratadas. Estas diferenças prendem-se, sobretudo, com a menor intensidade observada das bandas correspondentes às proteínas *penton base* e fibra, sendo esta diminuição de intensidade mais acentuada na amostra irradiada em substrato PBS (Figura 3.1A). Estes resultados indicam que a irradiação por feixe de eletrões a esta dose produz algumas alterações nas proteínas *penton base* e fibra do HAdV-5, levando à perda da sua antigenicidade, independentemente do substrato utilizado. Os resultados apontam, também, que o tipo de substrato possa ter influência na alteração das proteínas do HAdV-5 pela irradiação por feixe de eletrões. Isto porque para a mesma dose de radiação aplicada (13 kGy) a intensidade observada das bandas correspondentes às proteínas *penton base* e fibra é menor na amostra em PBS (Figura 3.1A) do que na amostra em efluente (Figura 3.1B). Apesar dos perfis de polipéptidos das suspensões virais em efluente irradiadas às doses de 13 e 18 kGy serem semelhantes é possível distinguir uma menor intensidade das bandas, correspondentes às proteínas *penton base* e fibra, na dose mais elevada (Figura 3.1B). Por fim, verifica-se ainda que o perfil de polipéptidos da suspensão viral em PBS irradiada à dose de 21 kGy apresenta apenas a banda correspondente à proteína hexão, comparativamente à amostra não tratada (Figura 3.1A). Este resultado sugere a degradação das proteínas *penton base* e fibra pela irradiação por feixe de eletrões a esta dose, não sendo possível visualizar as bandas correspondentes a estas proteínas pela sua incapacidade de ligação aos anticorpos policlonais.

Os perfis de polipéptidos correspondentes às suspensões de HAdV-5 tratadas por autoclavagem demonstram claras diferenças em relação aos perfis das amostras não tratadas em ambos os substratos testados (Figura 3.1A e 3.1B). Estas diferenças estão relacionadas com a presença de um conjunto de bandas de menores massas moleculares que podem ser resultado da degradação dos polipéptidos virais pela autoclavagem. Comparando os perfis das amostras autoclavadas, em ambos os substratos, não é detetada nenhuma diferença evidente, indicando que este tratamento não é influenciado pelo tipo de substrato utilizado.

Os perfis de polipéptidos correspondentes às suspensões de HAdV-5 tratadas por radiação UV, em ambos os substratos, não demonstram diferenças evidentes em relação aos perfis das amostras não tratadas, sugerindo que este tratamento não induz alterações detetáveis nas proteínas virais. Este resultado já era espetável, na medida em que foi anteriormente descrito que a radiação UV a este comprimento de onda (~254 nm) tem como principal alvo o DNA (Eischeid, Meyer and Linden 2009). Por fim, comparando os perfis destas amostras, em ambos os substratos, não é verificada nenhuma diferença entre eles, indicando não existir efeito do substrato no tratamento por radiação UV.

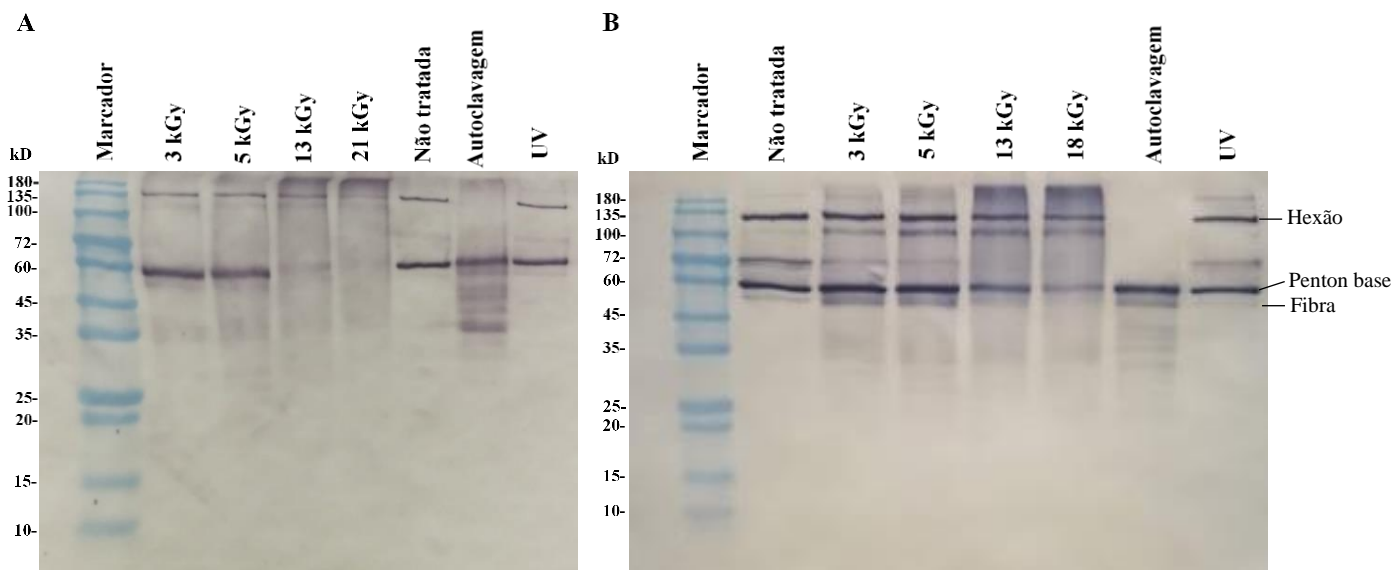


Figura 3.1- Western-blotting dos polipéptidos presentes nas suspensões de HAdV-5 (10^7 UFP/mL) em PBS e efluente (amostras tratadas e não tratadas). As suspensões de HAdV-5 em PBS e em efluente foram tratadas por irradiação por feixe de elétrons (3 - 21 kGy), por autoclavagem (121 °C a 1 atm durante 15 min) e por radiação UV (~254 nm durante 15 minutos). (A) Perfis dos polipéptidos das suspensões virais em PBS (B) Perfis dos polipéptidos das suspensões virais em efluente doméstico. Hexão (pII): 108 kDa; pTP: 77 kDa; pIIIa: 65 kDa; pIII: 63 kDa; pIV: 62 kDa; pV: 41 kDa; pVI: 27 kDa; pVIII: 25 kDa; pVII: 22 kDa; pIX: 14 kDa; pX: 9 kDa. Marcador de massa molecular: NZYBlue Protein (Nzytech, Lisboa, Portugal).

Para além do ensaio de *western-blotting* foi também realizado o ensaio de ELISA que, neste caso, utiliza anticorpos monoclonais (MAbs) anti-hexão que se ligam apenas às proteínas hexão presentes na cápside do HAdV-5. Este ensaio teve como objetivo avaliar, especificamente, a antigenicidade desta proteína (a mais abundante), após a aplicação dos vários tratamentos, através de um *kit* de diagnóstico comercial de forma a relacionar a utilização desta técnica e a inativação viral (Figura 3.2). A avaliação qualitativa da antigenicidade da proteína hexão é expressa pela percentagem de ligação relativa dos MAbs às proteínas hexão presentes nas amostras virais testadas. Esta percentagem de ligação relativa é calculada com base nos valores de absorvância obtidos nas amostras não tratadas, que se consideraram corresponderem a 100% de ligação relativa.

A Figura 3.2 ilustra a percentagem de ligação relativa dos MAbs às proteínas hexão do HAdV-5, presentes nas suspensões virais em PBS e efluente, em função do aumento da dose de radiação aplicada (kGy). A partir da análise da figura é possível observar uma diminuição da percentagem relativa de ligação com o aumento da dose de radiação aplicada, independentemente do tipo de substrato utilizado. Os valores de percentagem de ligação relativa correspondentes às suspensões virais irradiadas às doses de 3 e 5 kGy não demonstraram ser significativamente diferentes ($p > 0,05$) em relação às amostras não tratadas, para ambos os substratos. Estes resultados sugerem que a irradiação por feixe de elétrons a estas doses não induz alterações nas proteínas hexão, não diminuindo a sua ligação aos MAbs. Fazendo uma comparação destes resultados com os obtidos por *western-blotting* (Figura 3.1), verificamos uma concordância entre eles, na medida em que no ensaio de *western-blotting* também não se detetam alterações evidentes na proteína hexão após a irradiação a estas doses. Os valores de percentagem de ligação relativa obtidos para as suspensões virais irradiadas à dose de 13 kGy já

demonstraram ser significativamente inferiores ($p < 0,05$) em relação às suspensões virais não tratadas, para ambos os substratos, destacando que esta diminuição foi maior na amostra em PBS (Figura 3.2). Estes resultados sugerem que a irradiação por feixe de elétrons a esta dose tem um efeito nas proteínas hexão que, neste caso, se traduzem na diminuição da sua capacidade de ligação aos MAbs. Os resultados sugerem também que o tipo de substrato tem influência nas alterações causadas pela irradiação por feixe de elétrons, sendo que para a mesma dose de radiação aplicada (13 kGy) os valores de percentagem de ligação relativa da amostra em PBS são menores que os da amostra em efluente. Novamente, fazendo uma comparação entre estes resultados e os resultados obtidos por *western-blotting* verifica-se a sua conformidade, dado que no ensaio de *western-blotting* foi também verificada a diminuição da intensidade da banda correspondente à polipéptido hexão nas amostras irradiadas a esta dose (Figura 3.1). Para além disto, também se verificou nesse ensaio que esta diminuição de intensidade era mais acentuada para a amostra em PBS (Figura 3.1A) do que para a amostra em efluente (Figura 3.1B). Os valores de percentagem de ligação relativa obtidos para as amostras irradiadas à dose de 18 kGy demonstraram ser significativamente inferiores ($p < 0,05$) em relação às amostras não tratadas, em ambos os substratos, o que mais uma vez também está de acordo com a diminuição da intensidade da banda correspondente à polipéptido hexão na amostra viral em efluente irradiada a esta dose (Figura 3.1B). Os resultados obtidos no ensaio de ELISA neste estudo (Figura 3.2) assemelham-se a resultados obtidos anteriormente para a irradiação de amostras de HAdV-5 (em PBS e efluente) por radiação gama (Palma 2018), nos quais também se verificou a diminuição da percentagem de ligação relativa em função do aumento da dose de radiação aplicada (nesse caso 4 - 25 kGy).

Os valores de percentagem de ligação relativa correspondentes às suspensões virais tratadas por autoclavagem demonstraram ser significativamente inferiores, relativamente às amostras não tratadas, em ambos os substratos, sendo inferiores ao limite de deteção do método aplicado. Estes resultados indicam que este tratamento altera significativamente as proteínas hexão ou, possivelmente, induz a sua degradação, diminuindo a capacidade de ligação destas aos MAbs. Estes resultados estão, mais uma vez, de acordo com os resultados obtidos no ensaio de *western-blotting* em que não é possível visualizar a banda correspondente ao polipéptido hexão em nenhum dos perfis das suspensões virais em PBS e em efluente tratadas por autoclavagem (Figura 3.1).

Por outro lado, os valores de percentagem de ligação relativa registados para as suspensões virais tratadas por radiação UV, em ambos os substratos, não demonstraram diferenças significativas em relação às amostras não tratadas. Este resultado sugere que este tratamento não induz alterações significativas nas proteínas hexão do HAdV-5, tal como já tinha sido verificado no ensaio de *western-blotting* (Figura 3.1).

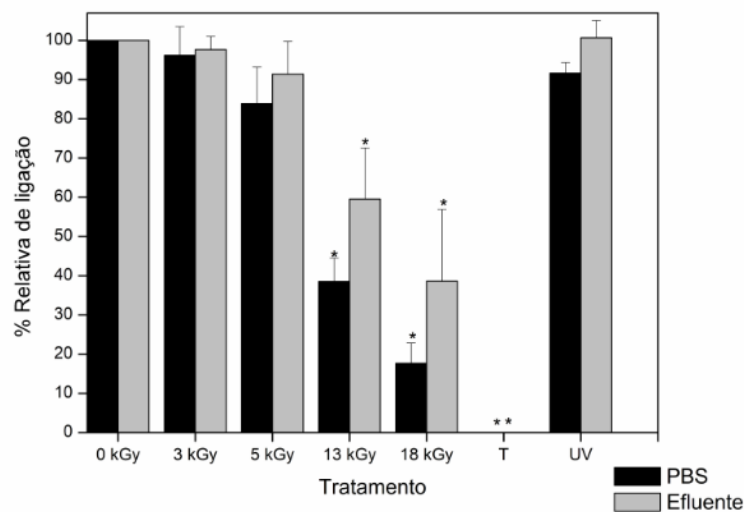


Figura 3.2- ELISA realizado para a detecção qualitativa da percentagem de ligação relativa dos anticorpos monoclonais anti-hexão às proteínas hexão do HAdV-5. Foram testadas amostras de HAdV-5 (10^7 UPF/mL) suspensas em PBS e efluente tratadas por irradiação por feixe de elétrons (3, 5, 13 e 18 kGy), por autoclavagem (T: 121 °C a 1 atm durante 15 minutos) e por radiação UV (~254 nm durante 15 minutos). Os * correspondem aos valores significativamente diferentes para um valor de $P < 0,05$ em relação aos valores da amostra não tratada. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% para a média ($2 < n < 8$ $\alpha = 0,05$).

3.2 Análise do efeito da irradiação por feixe de elétrons no genoma viral

A análise dos potenciais danos no DNA viral do HAdV-5, após a aplicação dos vários tratamentos, foi efetuada com recurso à amplificação de dois fragmentos distintos do genoma viral por PCR. As amostras de HAdV-5, suspensas em PBS e efluente, foram irradiadas a uma gama de doses entre os 3 e os 21 kGy.

Foram utilizados dois conjuntos de *primers* que permitiram analisar uma região do genoma viral compreendida entre os 17,8 e os 29 kpb. Esta região tem aproximadamente uma dimensão de 10 kpb num total de 39,5 kpb do genoma do HAdV-5, ou seja, representa cerca de 25% do genoma viral. Os dois conjuntos de *primers* amplificam dois fragmentos de DNA viral de tamanhos distintos, nomeadamente de 1 e 10 kpb. O fragmento de 1 kpb contém o gene que codifica a proteína VI. O fragmento de 10 kpb contém os genes que codificam as proteínas hexão (II), VI, VIII, protease (23K), DBP, 100K, 33K e 22K. Estes genes, contidos nos dois fragmentos de DNA, pertencem às regiões *late* 3 e 4 (L3 e L4) do genoma do HAdV-5 e codificam proteínas responsáveis pelas encapsidação, montagem e estabilização das partículas virais. A impossibilidade de amplificação dos fragmentos de DNA é atribuída a danos na sua dupla cadeia.

A Figura 3.3 ilustra os resultados mais representativos dos produtos amplificados pelos dois conjuntos de *primers* após a aplicação dos vários tratamentos às suspensões de HAdV-5 em PBS (Figura 3.3A e 3.3B) e em efluente (Figura 3.3C e 3.3D). A partir da análise destes resultados verifica-se que a amplificação dos fragmentos de 1 e de 10 kpb a partir das suspensões virais irradiadas por feixe de elétrons é diferente, independentemente do tipo de substrato utilizado.

O fragmento de 1 kpb foi amplificado nas amostras não tratadas e em todas as amostras irradiadas por feixe de elétrons (3 - 21 kGy) (Figura 3.3A e 3.3C). Estes resultados indicam que a

irradiação por feixe de elétrons a esta gama de doses não provocou danos detetáveis na cadeia dupla de DNA do HAdV-5, nomeadamente na região amplificada por estes *primers*, não tendo sido impedida a amplificação deste fragmento de DNA. Indicam também que o tipo de substrato utilizado não teve influência na ação da irradiação por feixe de elétrons no DNA viral.

O fragmento de 10 kpb foi amplificado nas amostras não tratadas e nas amostras irradiadas por feixe de elétrons à dose de 3 kGy em ambos os substratos (Figura 3.3B e Figura 3.3C). Este fragmento foi também amplificado na amostra viral em efluente irradiada à dose de 5 kGy (Figura 3.3D), mas o mesmo não aconteceu na amostra em PBS irradiada à dose de 4 kGy (Figura 3.3B). Estes resultados sugerem um efeito protetor do substrato efluente sobre o DNA contra os efeitos da irradiação por feixe de elétrons a estas doses. Isto porque as doses testadas, embora diferentes, são bastante próximas (4 e 5 kGy) e é possível verificar uma diferença entre elas, na amplificação do fragmento analisado. Para as amostras irradiadas às doses mais elevadas (12 – 21 kGy), em ambos os substratos, não foi detetada a amplificação deste fragmento, indicando que a irradiação por feixe de elétrons a estas doses seja capaz de provocar danos na cadeia dupla de DNA, pelo menos na região amplificada por este conjunto de *primers*.

Esta diferença de suscetibilidade na amplificação dos fragmentos estudados, relativamente aos danos no DNA do HAdV-5, pode dever-se ao tamanho da região amplificada. O fragmento de 10 kbp corresponde a uma região do genoma viral muito maior que o fragmento de 1 kpb e, por isso, existe uma maior probabilidade de sofrer danos pela radiação. Já foram descritos resultados semelhantes para a diferença de suscetibilidade na amplificação destes fragmentos de DNA do HAdV-5 para a radiação gama (Palma 2018).

Para as suspensões de HAdV-5 tratadas por autoclavagem e por radiação UV não foi detetada a amplificação de nenhum dos fragmentos estudados em ambos os substratos. Estes resultados sugerem que estes dois tipos de tratamento danificam a dupla cadeia de DNA do HAdV-5, resultando na ausência de amplificação dos dois fragmentos. Para além disto, indicam igualmente que o tipo de substrato não tem um efeito protetor contra os danos causados no genoma viral pelos dois tipos de tratamento. A literatura existente suporta os resultados obtidos para estes dois processos de desinfecção, tendo sido reportado que a temperatura elevada leva à degradação do DNA (Oei *et al.* 2015) e a radiação UV a 254 nm tem como alvo principal a estrutura da dupla cadeia de DNA (Eischeid, Meyer and Linden 2009).

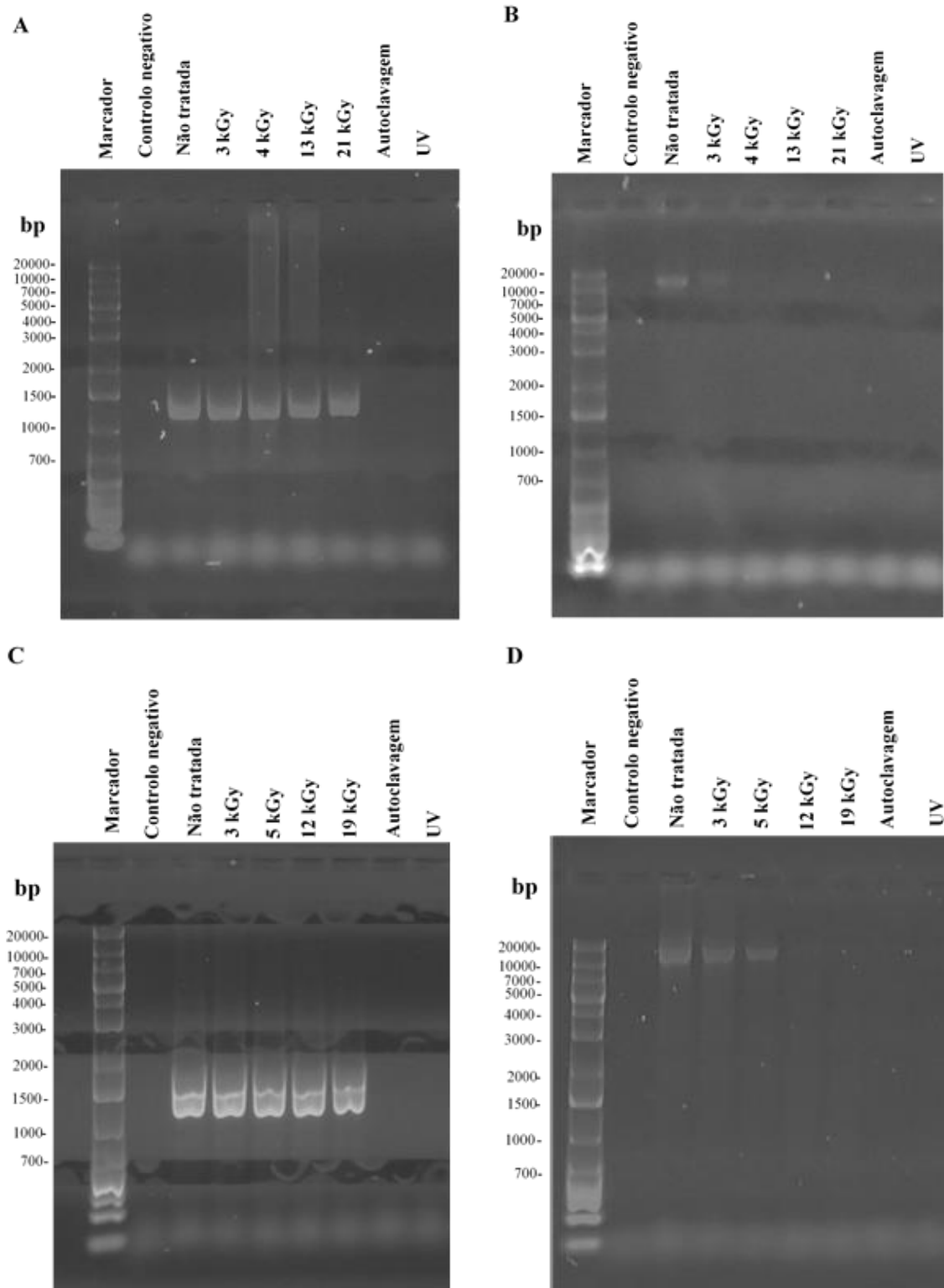


Figura 3.3- Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos amplificados por PCR. As suspensões de HAdV-5 em PBS e em efluente foram tratadas por irradiação por feixe de elétrons (3 - 21 kGy), por autoclavagem (121 °C a 1 atm durante 15 min) e por radiação UV (~254 nm durante 15 minutos) (A) Amplificação do fragmento de 1 kpb das suspensões virais em PBS (tratadas e não tratadas) (B) Amplificação do fragmento de 10 kpb das suspensões virais em PBS (tratadas e não tratadas). (C) Amplificação do fragmento de 1 kpb das amostras em efluente (tratadas e não tratadas). (D) Amplificação do fragmento de 10 kpb das amostras em efluente (tratadas e não tratadas). Marcador de massas moleculares: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, EUA).

3.3 Análise do efeito da irradiação por feixe de elétrons na infeciosidade viral

A infeciosidade das suspensões de HAdV-5 em PBS e em efluente, após a aplicação dos vários tratamentos, foi analisada através da técnica de ensaio em placa, utilizando a linha celular A549. As amostras de HAdV-5 foram irradiadas por feixe de elétrons a uma gama de doses compreendida entre 3 e 20 kGy.

Quando uma suspensão viral é irradiada a doses incrementais, o número de partículas virais viáveis, após cada dose incremental aplicada, pode ser utilizado para construir uma curva de viabilidade, isto é, a variação logarítmica das frações viáveis (infeciosas) em função da dose de radiação absorvida (kGy). Estas curvas de viabilidade, na maioria dos casos, seguem uma cinética exponencial.

A Figura 3.4 ilustra a redução logarítmica (UFP/mL) de partículas infeciosas de HAdV-5 em função do aumento da dose de radiação aplicada (kGy). A partir da análise desta figura é possível verificar que o número de partículas infeciosas de HAdV-5 (UFP/mL) diminui linearmente em função do aumento da dose de radiação aplicada (kGy), independentemente do substrato utilizado.

As suspensões virais irradiadas às doses de 3 e 5 kGy em substrato PBS apresentaram uma redução logarítmica de cerca de 1 e 2 log UFP/mL, respetivamente. Enquanto que para as mesmas doses aplicadas foi detetada uma redução de apenas 1 log de UFP/mL em substrato efluente. Estes resultados demonstram uma redução de partículas infeciosas de HAdV-5 não muito acentuada (entre 1 e 2 log UFP/mL), sugerindo uma elevada resistência dos adenovírus face à irradiação por feixe de elétrons. A redução de partículas infeciosas de HAdV-5 estimada para a dose aplicada de 13 kGy, foi de 4 e 3 log UFP/mL para as amostras em PBS e efluente, respetivamente.

De forma geral, foi estimada uma redução máxima de partículas virais infeciosas de cerca de 5 e 7 log UFP/mL para as amostras irradiadas às doses de 19 e 20 kGy em substrato efluente e PBS, respetivamente. Para além disto, sendo estas doses muito próximas é possível sugerir a influência do substrato na redução da infeciosidade do HAdV-5, dado existir uma diferença de 2 log entre os valores registados para os dois substratos.

Em suma, os resultados de infeciosidade indicam que é necessário aplicar doses de radiação por feixe de elétrons de pelo menos 13 kGy para obter eficiências de desinfeção superiores a 99,99% (4 log UFP/mL).

O tratamento por autoclavagem reduziu por completo o número de partículas virais infeciosas em ambos os substratos utilizados, equivalente a 7 log UFP/mL. Estes resultados corroboram o descrito anteriormente para a inativação de HAdV-5, para o qual foi citado uma redução de mais de 8 log UFP/mL pela exposição a temperaturas superiores ou iguais a 70 °C durante 20 min (Maheshwari *et al.* 2004).

A exposição à radiação UV, nas condições utilizadas, demonstrou reduzir o número de partículas virais infeciosas em ambos os substratos em apenas 2 log de UFP/mL. Os resultados obtidos assemelham-se ao reportado na literatura para a exposição de HAdV à radiação UV (~ 254 nm), onde é descrita uma redução entre 2 e 4 log UFP/mL (Eischeid, Meyer and Linden 2009).

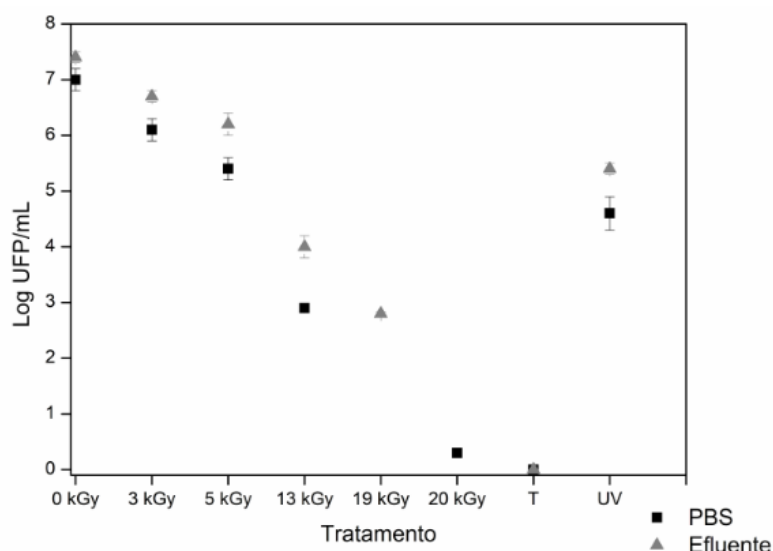


Figura 3.4- Curvas de viabilidade das amostras de HAdV-5 em dois tipos de substratos aquosos (PBS e efluente). As suspensões virais foram tratadas por irradiação por feixe de elétrons (3 - 20 kGy), por autoclavagem (T, 121 °C a 1 atm durante 15 minutos). UV: tratamento por radiação UV (UV, 254 nm durante 15 minutos). As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% para a média ($2 < n < 14$ $\alpha = 0,05$).

De forma a caracterizar os organismos de acordo com a sua sensibilidade à radiação é utilizado o valor de D_{10} . Este valor é definido como a dose necessária para inativar 90% da população ou como a dose de irradiação necessária para ocorrer a redução de 1 log na população. A Tabela 3.1 contém os valores de D_{10} calculados para o HAdV-5 irradiado nos dois substratos. O valor de D_{10} obtido para as amostras irradiadas por feixe de elétrons em PBS foi 3 kGy, ou seja, para reduzir um 1 log UFP/mL da população de HAdV-5 neste substrato é necessário aplicar uma dose de 3 kGy. O valor de D_{10} obtido para as amostras irradiadas por feixe de elétrons em efluente foi 4 kGy. Estes valores de D_{10} salientam o efeito do substrato efluente na proteção dos efeitos da irradiação por feixe de elétrons em adenovírus. Os valores de D_{10} podem ser utilizados para fazer uma extrapolação da dose que é necessária aplicar para atingir uma determinada redução logarítmica de partículas virais infecciosas. Por exemplo, para atingir uma redução de 4 log UFP/mL, como processo de desinfecção de efluentes, deverá ser utilizada uma dose de radiação de 16 kGy.

Tabela 3.1- Valores de D_{10} calculados para o HAdV-5 nos diferentes substratos.

Substrato	CQO (mg O ₂ /L)	Valores de D_{10} (kGy)
Tampão fosfato salino (pH 7.2)	< 50	3
Efluente	57 - 76	4

3.3.1. Danos no DNA e infeciosidade viral

A análise de parte do genoma do HAdV-5 indicou a ocorrência de danos no DNA, consequentes da irradiação por feixe de elétrons, a partir das doses intermédias aplicadas (12 e 13 kGy) às suspensões virais em ambos os substratos. Por sua vez, na análise da infeciosidade do HAdV-5, observou-se que a exposição a doses superiores a 13 kGy originou uma redução de UFP/mL igual ou superior a 4 log em substrato PBS e 3 log em substrato efluente. Comparando os resultados obtidos em ambos os ensaios, pode ser sugerido que os danos na dupla cadeia de DNA do HAdV-5, após a irradiação por feixe de elétrons, possam estar relacionados com a redução na infeciosidade do mesmo, devido à incapacidade de replicação do genoma. A mesma relação entre a ausência de amplificação e a redução da infeciosidade viral foi verificada nas amostras de HAdV-5 tratadas por autoclavagem e por radiação UV em ambos os substratos.

3.3.2. Alterações nas proteínas e infeciosidade viral

Como foi referido na introdução desta dissertação as proteínas presentes na cápside do adenovírus são componentes cruciais no seu ciclo infecioso e, por isso, a alteração/degradação destas pode comprometer a infeciosidade das partículas virais.

A análise das alterações nas proteínas constituintes do HAdV-5 demonstrou que os efeitos da irradiação por feixe de elétrons se tornam visíveis após o tratamento a doses iguais ou superiores a 13 kGy, para ambos os substratos. Por outro lado, a análise da redução de infeciosidade viral, para a mesma dose de radiação aplicada, demonstrou uma redução significativa na quantidade de partículas virais infeciosas também para ambos os substratos. Relacionando os resultados, a perda de infeciosidade de HAdV-5, por irradiação por feixe de elétrons, pode dever-se também a alterações nas proteínas da cápside viral, nomeadamente nas proteínas *penton base* e fibra. Como foi referido também na introdução, estas proteínas têm um papel muito importante na adsorção do virião à célula e na sua internalização e, por isso, alterações nestas proteínas comprometem o estágio inicial da infeção viral. A mesma relação entre as alterações nas proteínas e a redução de infeciosidade foi verificada nas amostras de HAdV-5 tratadas por autoclavagem em ambos os substratos. No entanto, esta relação não se verificou nas amostras tratadas por radiação UV. Para este tratamento, não foram detetadas alterações evidentes nas proteínas virais, mas foi estimada uma redução de 2 log UFP/mL de partículas virais, sugerindo que neste caso a redução da infeciosidade do HAdV-5 possa estar apenas relacionada com danos na dupla cadeia de DNA.

4. Conclusão

A irradiação por feixe de elétrons demonstrou ter a capacidade de induzir alterações nas proteínas constituintes do HAdV-5 à dose de 13 kGy e a doses superiores, independentemente do substrato utilizado. Por outro lado, evidenciou causar danos na dupla cadeia de DNA do HAdV-5 à dose de 12 kGy e a doses superiores para ambos os substratos. O tratamento por feixe de elétrons também indicou ser eficaz na redução da infeciosidade viral, tendo sido registada uma redução máxima de cerca de 5 e 7 log UFP/mL nas suspensões virais irradiada às doses de 19 e 20 kGy em efluente e em PBS, respetivamente.

Tendo em conta os resultados obtidos nas condições testadas, o HAdV-5 sugeriu ser mais sensível à irradiação por feixe de elétrons quando suspenso em PBS do que em efluente. Uma vez que parte do efeito da radiação ionizante num organismo é devido ao efeito indireto de radicais livres, resultante da radiólise da água, a natureza do substrato na qual o vírus é suspenso pode ter um papel marcante na determinação da dose necessária para efetuar a sua desinfeção. Os substratos utilizados neste estudo são soluções aquosas que apresentam diferentes conteúdos em matéria orgânica. Este facto pode ter estado na base das diferenças nos resultados observados, sugerindo que o substrato efluente possa ter tido um efeito protetor dos efeitos da irradiação por feixe de elétrons no vírus.

Os resultados obtidos não permitem, no entanto, atribuir a redução da infeciosidade viral a nenhum destes mecanismos virucidas, alteração das proteínas ou degradação do genoma, de forma isolada.

Dos três tratamentos de desinfeção testados neste trabalho, a radiação UV demonstrou ser o menos eficiente na inativação do HAdV-5, sendo que foi verificada uma redução de apenas 2 log de UFP/mL de partículas virais infeciosas. Por outro lado, o tratamento por autoclavagem destacou a sua eficiência na inativação do HAdV-5, independentemente do tipo de substrato utilizado, tendo atingido uma redução de cerca de 7 log UFP/mL. O tratamento por irradiação por feixe de elétrons demonstrou ter ação virucida, atingindo o mesmo valor de redução logarítmica de 7 log UFP/mL após irradiação à dose de 20 kGy em PBS. No efluente a redução de partículas infeciosas foi inferior, alcançando-se cerca de 5 log UFP/mL à dose de 19 kGy. Adicionalmente, estes resultados indicam que a irradiação por feixe de elétrons pode ser utilizada para garantir os parâmetros estabelecidos pela US EPA (US EPA 2004), para a desinfeção viral de águas de consumo, correspondente à redução de partículas virais em 99,99% (4 log UFP/mL).

Concluindo, a irradiação por feixe de elétrons demonstrou possuir capacidade virucida contra o HAdV-5 nas condições testadas neste estudo, reforçando a potencial aplicação desta tecnologia como tratamento terciário alternativo ou complementar de efluentes de forma a mitigar a presença de vírus entéricos nos sistemas de água garantindo a sua segurança e sustentabilidade.

5. Perspetivas futuras

Este estudo focou-se apenas na inativação do adenovírus humano tipo 5 por irradiação por feixe de eletrões em substratos aquosos, visto que este vírus é o mais prevalente nos ambientes aquáticos. Contudo, apesar de terem sido avaliados qualitativamente os efeitos desta tecnologia nos vários constituintes do vírus (proteínas e DNA) é necessário um estudo mais profundo destes efeitos, de forma a compreender mais os mecanismos de ação desta irradiação sobre o adenovírus. Este estudo pode vir a ser particularmente interessante e útil como ferramenta de atenuação viral para uso em vacinas HAdV-*based*. Adicionalmente, seria importante testar os efeitos desta tecnologia em outros vírus entéricos humanos presentes em águas de forma a validá-la como processo de desinfeção viral a ser aplicada em ETARs.

6. Referências

- Aslan A, Xagorarakis I, Simmons FJ *et al.* Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *J Appl Microbiol* 2011;**111**:1250–61.
- Bergelson JM. Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Science* (80-) 1997;**275**:1320–3.
- Bisseux M, Colombet J, Mirand A *et al.* Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: A one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Eurosurveillance* 2018;**23**, DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.7.17-00237.
- Bosch A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol* 1998;**1**:191–6.
- Bosshard F, Armand F, Hamelin R *et al.* Mechanisms of human adenovirus inactivation by sunlight and UVC light as examined by quantitative PCR and quantitative proteomics. *Appl Environ Microbiol* 2013;**79**:1325–32.
- Brahmakshatriya V, Lupiani B, Brinlee JL *et al.* Preliminary study for evaluation of avian influenza virus inactivation in contaminated poultry products using electron beam irradiation. *Avian Pathol* 2009;**38**:245–50.
- Briser JR, Ako-Adjei D, Bao Y *et al.* NCBI viral genomes resource. *Nucleic Acids Res* 2015;**43**:D571–7.
- Carr M, Kajon AE, Lu X *et al.* Deaths Associated with Human Adenovirus-14p1 Infections, Europe, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* 2011, DOI: 10.3201/eid1708.101760.
- Cecuk D, Kruzic V, Turkovic B *et al.* Human viruses in the coastal environment of a Croatian harbor. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1993;**41**:487–93.
- Chatterjee PK, Vayda ME, Flint SJ. Interactions among the three adenovirus core proteins. *J Virol* 1985;**55**:379–86.
- Chroboczek J, Ruigrok RW, Cusack S. Adenovirus fiber. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;**199** (Pt 1):163–200.
- Cloete TE, Silva E Da, Nel LH. Removal of Waterborne Human Enteric Viruses and Coliphages with Oxidized Coal. *Curr Microbiol* 1998;**37**:23–7.
- Crabtree KD, Gerba CP, Rose JB *et al.* Waterborne adenovirus: A risk assessment. *Water Sci Technol* 1997;**35**:1–6.
- Crittenden JC (John C, Montgomery Watson Harza (Firm). *MWH's Water Treatment : Principles and Design*. John Wiley & Sons, 2012.
- Dewailly E, Poirier C, Meyer FM. Health hazards associated with windsurfing on polluted water. *Am J Public Health* 1986;**76**:690–1.
- Dhingra A, Hage E, Ganzenmueller T *et al.* Molecular Evolution of Human Adenovirus (HAdV) Species C. *Sci Rep* 2019;**9**:1039.
- Divizia M, Gabrieli R, Donia D *et al.* Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Sci Technol* 2004;**50**:57–61.
- Eischeid AC, Meyer JN, Linden KG. UV disinfection of adenoviruses: molecular indications of DNA damage efficiency. *Appl Environ Microbiol* 2009;**75**:23–8.
- Espinosa AC, Jesudhasan P, Arredondo R *et al.* Quantifying the Reduction in Potential Health Risks by Determining the Sensitivity of Poliovirus Type 1 Chat Strain and Rotavirus SA-11 to Electron Beam Irradiation of Iceberg Lettuce and Spinach. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**:988–93.
- Everitt E, Sundquist B, Pettersson U *et al.* Structural proteins of adenoviruses: X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2. *Virology* 1973;**52**:130–47.

- Ferreira ICFR, Antonio AL, Cabo Verde S eds. *Food Irradiation Technologies*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017.
- Flint SJ, Racaniello VR (Vincent R., Rall GF *et al.* *Principles of Virology*. 4th edition., 2015.
- Fong T-T, Lipp EK. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;**69**:357–71.
- Gall AM, Mariñas BJ, Lu Y *et al.* Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water. *PLoS Pathog* 2015;**11**:1–7.
- Garnett CT, Erdman D, Xu W *et al.* Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol* 2002;**76**:10608–16.
- Gelderblom HR. Structure and Classification of Viruses. 1996.
- Gerba, CP; Enriquez C. Virus-associated outbreaks in swimming pools. *Water Chem Disinfect Swim pools spas Natl Spa Pool Institute, Alexandria, VA*, 1997:31–45.
- Gerba CP, Rose JB. Viruses in Source and Drinking Water. Springer, New York, NY, 1990, 380–96.
- Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2014;**4**:26–33.
- Haas CN, Rose JB, Gerba C *et al.* Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Anal* 1993;**13**:545–52.
- HAdV Working Group. Human Adenovirus Genotype Classification.
- Hashimoto S, Gonzalez G, Harada S *et al.* Recombinant type Human mastadenovirus D85 associated with epidemic keratoconjunctivitis since 2015 in Japan. *J Med Virol* 2018;**90**:881–9.
- Hay RT, Freeman A, Leith I *et al.* Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;**199 (Pt 2)**:31–48.
- Hernigou P, Gras G, Marinello G *et al.* Influence of Irradiation on the Risk of Transmission of HIV in Bone Grafts Obtained from Appropriately Screened Donors and Followed by Radiation Sterilization. *Cell Tissue Bank* 2000;**1**:279–89.
- Hong J-Y, Lee H-J, Piedra PA *et al.* Lower Respiratory Tract Infections due to Adenovirus in Hospitalized Korean Children: Epidemiology, Clinical Features, and Prognosis. *Clin Infect Dis* 2001;**32**:1423–9.
- Horne RW, Brenner S, Waterson AP *et al.* The icosahedral form of an adenovirus. *J Mol Biol* 1959;**1**:84–6.
- Hundes A, Maluquer de Motes C, Bofill-Mas S *et al.* Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol* 2006;**72**:7886–93.
- International Consultative Group on Food Irradiation (ICGFI). Review of Data on High Dose (10-70 kGy Irradiation Food: Report of a Consulation, Karlsruhe, 29 August - 2 September 1994. *World Heal Organ* 1995.
- Ison MG. Emerging Infections: Adenovirus Infections in Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 2006;**43**:331–9.
- Jiang S, Noble R, Chu W. Human Adenoviruses and Coliphages in Urban Runoff-Impacted Coastal Waters of Southern California. *Appl Environ Microbiol* 2001;**67**:179.
- Jones MS, Harrach B, Ganac RD *et al.* New Adenovirus Species Found in a Patient Presenting with Gastroenteritis. *J Virol* 2007;**81**:5978–84.
- Kirby I, Davison E, Beavil AJ *et al.* Mutations in the DG loop of adenovirus type 5 fiber knob protein abolish high-affinity binding to its cellular receptor CAR. *J Virol* 1999;**73**:9508–14.
- Kocwa-Haluch R. Waterborne Enteroviruses as a Hazard for Human Health. *Polish J Environ Stud* 2001;**10**:485–7.

- Koide H, Kitaura Y, Deguchi H *et al.* Genomic detection of enteroviruses in the myocardium--studies on animal hearts with coxsackievirus B3 myocarditis and endomyocardial biopsies from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 1992;**56**:1081–93.
- Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 2003;**13**:155–71.
- Koneru B, Atchison R, Jaffe R *et al.* Serological studies of adenoviral hepatitis following pediatric liver transplantation. *Transplant Proc* 1990;**22**:1547–8.
- Kukkula M, Arstila P, Klossner M-L *et al.* Waterborne Outbreak of Viral Gastroenteritis. *Scand J Infect Dis* 1997;**29**:415–8.
- Lee S-H, Kim S-J. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res* 2002;**36**:248–56.
- Li E, Stupack D, Bokoch GM *et al.* Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol* 1998a;**72**:8806–12.
- Li E, Stupack D, Klemke R *et al.* Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. *J Virol* 1998b;**72**:2055–61.
- Li JW, Wang XW, Rui QY *et al.* A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *J Virol Methods* 1998c;**74**:99–108.
- Li L, Guo W, Yan Y *et al.* Label-free super-resolution imaging of adenoviruses by submerged microsphere optical nanoscopy. *Light Sci Appl* 2013;**2**:e104–e104.
- Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2014;**27**:441–62.
- Lipp EK, Jarrell JL, Griffin DW *et al.* Preliminary evidence for human fecal contamination in corals of the Florida Keys, USA. *Mar Pollut Bull* 2002;**44**:666–70.
- LIPP EK, ROSE JB. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev Sci Tech l'OIE* 1997;**16**:620–40.
- Madigan MT, Martinko JM, Brock TD. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Prentice Hall, 2006.
- Maheshwari G, Jannat R, McCormick L *et al.* Thermal inactivation of adenovirus type 5. *J Virol Methods* 2004;**118**:141–6.
- Mark Plavsic RWN. Efficacy of Electron Beam for Viral Inactivation. *J Microb Biochem Technol* 2015;**07**:173–6.
- Martín CS. Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses* 2012;**4**:847–77.
- Mennechet FJD, Paris O, Ouoba AR *et al.* A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence. *Expert Rev Vaccines* 2019;**18**:597–613.
- Mitchell LS, Taylor B, Reimels W *et al.* Adenovirus 7a: a community-acquired outbreak in a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J* 2000;**19**:996–1000.
- Montone KT, Furth EE, Pietra GG *et al.* Neonatal adenovirus infection: a case report with in situ hybridization confirmation of ascending intrauterine infection. *Diagn Cytopathol* 1995;**12**:341–4.
- Muscillo M, Aulicino FA, Patti AM *et al.* Molecular techniques for the identification of enteric viruses in marine waters. *Water Res* 1994;**28**:1–7.
- Nilsson EC, Storm RJ, Bauer J *et al.* The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. *Nat Med* 2011;**17**:105–9.
- Norrbý E, Bartha A, Boulanger P *et al.* Adenoviridae. *Intervirology* 1976;**7**:117–25.
- Oei AL, Vriend LEM, Crezee J *et al.* Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiat Oncol* 2015;**10**:165.
- Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Public Health* 2010;**7**:2620–37.
- van Oostrum J, Burnett RM. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J Virol*

1985;**56**:439–48.

- Palma CR. Adenoviruses ' inactivation mechanisms by gamma radiation. 2018.
- Pond K, World Health Organization. S and HT. *Water Recreation and Disease: Plausibility of Associated Infections*. Published on behalf of the World Health Organization by IWA Pub, 2005.
- Praveen C, Dancho BA, Kingsley DH *et al*. Susceptibility of Murine Norovirus and Hepatitis A Virus to Electron Beam Irradiation in Oysters and Quantifying the Reduction in Potential Infection Risks. *Appl Environ Microbiol* 2013;**79**:3796–801.
- Prchla E, Plank C, Wagner E *et al*. Virus-mediated release of endosomal content in vitro: different behavior of adenovirus and rhinovirus serotype 2. *J Cell Biol* 1995;**131**:111–23.
- Predmore A, Sanglay GC, DiCaprio E *et al*. Electron beam inactivation of Tulane virus on fresh produce, and mechanism of inactivation of human norovirus surrogates by electron beam irradiation. *Int J Food Microbiol* 2015;**198**:28–36.
- Preuss T, Kamstrup S, Kyvsgaard NC *et al*. Comparison of two different methods for inactivation of viruses in serum. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;**4**:504–8.
- Rekosh DMK, Russell WC, Bellet AJD *et al*. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Virology* 1977;**11**:293–5.
- Robinson CM, Singh G, Lee JY *et al*. Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci Rep* 2013;**3**:1812.
- Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM *et al*. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev* 2012;**36**:786–814.
- Rodríguez RA, Bounty S, Linden KG. Long-range quantitative PCR for determining inactivation of adenovirus 2 by ultraviolet light. *J Appl Microbiol* 2013;**114**:1854–65.
- Rose JB, Mullinax RL, Singh SN *et al*. Occurrence of rotaviruses and enteroviruses in recreational waters of Oak Creek, Arizona. *Water Res* 1987;**21**:1375–81.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK *et al*. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;**84**:570–3.
- Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 2000;**2**:1–48.
- Russell WC. Adenoviruses: Update on structure and function. *J Gen Virol* 2009;**90**:1–20.
- Santis G, Legrand V, Hong SS *et al*. Molecular determinants of adenovirus serotype 5 fibre binding to its cellular receptor CAR. *J Gen Virol* 1999;**80**:1519–27.
- Savón C, Acosta B, Valdés O *et al*. A myocarditis outbreak with fatal cases associated with adenovirus subgenera C among children from Havana City in 2005. *J Clin Virol* 2008;**43**:152–7.
- Schnell MA, Zhang Y, Tazelaar J *et al*. Activation of Innate Immunity in Nonhuman Primates Following Intraportal Administration of Adenoviral Vectors. *Mol Ther* 2001;**3**:708–22.
- Seto D, Chodosh J, Brister JR *et al*. Using the Whole-Genome Sequence To Characterize and Name Human Adenoviruses. *J Virol* 2011;**85**:5701–2.
- Siminovich M, Murtagh P. Acute Lower Respiratory Tract Infections by Adenovirus in Children: Histopathologic Findings in 18 Fatal Cases. *Pediatr Dev Pathol* 2011;**14**:214–7.
- Sirikanchana K, Shisler JL, Mariñas BJ. Effect of exposure to UV-C irradiation and monochloramine on adenovirus serotype 2 early protein expression and DNA replication. *Appl Environ Microbiol* 2008;**74**:3774–82.
- Sobsey MD, Shields PA, Hauchman FH *et al*. SURVIVAL AND TRANSPORT OF HEPATITIS A VIRUS IN SOILS, GROUNDWATER AND WASTEWATER. *Water Sci Technol* 1986;**18**:97–106.
- Stewart PL, Chiu CY, Huang S *et al*. Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *EMBO J* 1997;**16**:1189–98.
- Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW *et al*. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at

- very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol* 1996;**70**:2296–306.
- US EPA. Comprehensive Surface Water Treatment Rules. Quick Reference Guide: Systemas Using Conventional or Direct Filtration. 2004.
- US EPA. 40 CFR Parts 9, 141, and 142. *National Primary Drinking Water Regulations: Stage 2 Disinfectants and Disinfection Byproducts Rule; Final Rule.*, 2006.
- Valentine RC, Pereira HG. Antigens and structure of the adenovirus. *J Mol Biol* 1965;**13**:13-IN13.
- Vellinga J, Van der Heijdt S, Hoeben RC. The adenovirus capsid: Major progress in minor proteins. *J Gen Virol* 2005;**86**:1581–8.
- Wagenknecht LE, Roseman JM, Herman WH. Increased Incidence of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Following an Epidemic of Coxsackievirus B5. *Am J Epidemiol* 1991;**133**:1024–31.
- Wang H, Li Z-Y, Liu Y *et al.* Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med* 2011;**17**:96–104.
- Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A *et al.* Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol* 1998;**72**:3455–8.
- WHO. *Guidelines for Drinking-Water Quality FOURTH EDITION WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Guidelines for Drinking-Water Quality-4 Th Ed.*, 2011.
- WHO. *Water Sanitation Hygiene*. World Health Organization, 2014.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheres DA *et al.* Integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993;**73**:309–19.
- Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L *et al.* Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. *J Virol* 2005;**79**:1992–2000.
- Wong K, Fong TT, Bibby K *et al.* Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ Int* 2012;**45**:151–64.
- Yates M V, Gerba CP, Kelley LM. Virus persistence in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 1985;**49**:778–81.
- Yu D. *Adenovirus for Cancer Therapy : With a Focus on Its Surface Modification.*, 2013.